Εθνικό Μετσόβιο Πολυτεχνείο
Σχολή Χημικών Μηχανικών
Τομέας IV: Σύνθεση & Ανάπτυξη Βιομηχανικών Διαδικασιών
Εργαστήριο Χημείας & Τεχνολογίας Τροφίμων

Αξιοποίηση όξινου ορού γιαουρτιού για παραγωγή γαλακτοολιγοσακχαριτών με χρήση βιοκαταλυτών

Τσίκα Έλενα

Επιβλέπων Καθηγητής: Ταούκης Πέτρος

ΦΕΒΡΟΥΑΡΙΟΣ 2019

Πρόλογος

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Χημείας και Τεχνολογίας Τροφίμων της Σχολής Χημικών Μηχανικών του ΕΜΠ κατά το χρονικό διάστημα 03/2018-02/2019, υπό την επίβλεψη του Καθηγητή του Εθνικού Μετσόβιου Πολυτεχνείου κ. Πέτρου Ταούκη.

Με την ολοκλήρωσή της, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον επιβλέποντα καθηγητή κ. Πέτρο Ταούκη για την ευκαιρία που μου προσέφερε να ασχοληθώ με τον τομέα της χημείας και τεχνολογίας τροφίμων, την καθοδήγησή του και όλες τις πολύτιμες γνώσεις που μου προσέφερε κατά τη διάρκεια των σπουδών μου. Ακόμη, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Επίκουρο Καθηγητή κ. Ευάγγελο Τόπακα για την υποστήριξη και την καθοδήγησή του κατά τη διάρκεια της εκπόνησης της παρούσας διπλωματικής εργασίας.

Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαιτέρως τη Δρ. Μαρία Τσεβδού, το μέλος ΕΔιΠ του Εργαστηρίου Χημείας & Τεχνολογίας Τροφίμων, Δρ. Δημήτρη Τσιμογιάννη και τον Υποψήφιο Διδάκτορα κ. Αθανάσιο Λημναίο για τις αμέτρητες ώρες πειραμάτων και συζητήσεων, την εμπιστοσύνη τους σε μένα, τη βοήθεια και τη στήριξή τους, που αποτέλεσαν βασικό παράγοντα για την περάτωση της παρούσας εργασίας, καθώς και το μέλος ΕΔιΠ του Οριζόντιου Εργαστηρίου Ελέγχου και Ποιότητας Διεργασιών και Προϊόντων, κα. Θεοπίστη Λυμπεροπούλου για τη βοήθεια και την εμπιστοσύνη της σχετικά με τις αναλύσεις που πραγματοποιήθηκαν στο σύστημα HPAEC-PAD.

Ευχαριστώ ακόμα τους Καθηγητές, τους Υποψήφιους Διδάκτορες και τους συμφοιτητές μου στο Εργαστήριο Χημείας και Τεχνολογίας Τροφίμων του ΕΜΠ, για τη συνεργασία μας και το φιλικό κλίμα καθ' όλη τη διάρκεια της εκπόνησης της διπλωματικής μου εργασίας.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τους ανθρώπους που ήταν δίπλα μου όλα αυτά τα χρόνια της διαδρομής μου στο ΕΜΠ. Τους φίλους μου, εντός και εκτός σχολής, που μοιράστηκαν μαζί μου πολλές ωραίες στιγμές, καθιστώντας τα φοιτητικά μου χρόνια μια από τις ομορφότερες περιόδους της έως τώρα ζωής μου, και την οικογένειά μου για τη συμπαράσταση και υπομονή που έδειξαν κατά τη διάρκεια εκπόνησης της διπλωματικής μου εργασίας, αλλά και καθ' όλη τη διάρκεια των σπουδών μου.

Τσίκα Έλενα

Φεβρουάριος 2019

Περίληψη

Η παρούσα διπλωματική εργασία έχει ως στόχο τη μελέτη της αξιοποίησης του όξινου ορού γιαουρτιού, μέσω της παραγωγής γαλακτοολιγοσακχαρίτών (Galactooligosaccharides, GOS) από την περιεχόμενη σε αυτόν λακτόζη. Ως βιοκαταλύτης χρησιμοποιήθηκε το ένζυμο β-γαλακτοζιδάση από τον μικροοργανισμό *Kluyveromyces lactis*.

Αρχικά υπολογίστηκε η ενζυμική ενεργότητα της β-γαλακτοζιδάσης από τον μικροοργανισμό *K. lactis*, η οποία βρέθηκε ίση προς 13,15 (±0,57) U/mL. Η ποσοτικοποίηση των αποτελεσμάτων των ενζυμικών αντιδράσεων πραγματοποιήθηκε με ανάλυση των δειγμάτων με υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης με ανιχνευτή δείκτη διάθλασης (High Performance Liquid Chromatography-RI detector, HPLC-RI). Λόγω της χαμηλής διαχωριστικής ικανότητας του συστήματος HPLC στην ανάλυση μορίων ίδιου βαθμού πολυμερισμού με διαφορετικούς μονοσακχαρίτες ή/και γλυκοζιτικούς δεσμούς, ορισμένα από τα δείγματα αναλύθηκαν με χρωματογραφία ανιονεναλλαγής υψηλής απόδοσης με παλμικό αμπερομετρικό ανιχνευτή (High Performance Anion-Exchange Chromatography - Pulsed Amperometric Detection, HPAEC-PAD), όπου ήταν εφικτός ο πλήρης διαχωρισμός όλων των μονοσακχαριτών, δισακχαριτών και παραγόμενων ολιγοσακχαριτών.

Βασικό αντικείμενο μελέτης, αποτέλεσε ο προσδιορισμός της επίδρασης της περιεκτικότητας σε λακτόζη του υποστρώματος και της ενεργότητας του ενζύμου στο βαθμό απόδοσης σε GOS. Για το σκοπό αυτό, χρησιμοποιήθηκε όξινος ορός περιεκτικότητας σε λακτόζη 3,5%, 9%, 14% και 17% κ.ό. και ενζυμική ενεργότητα 0,013, 0,026 και 0,052 U/mL, στις βέλτιστες συνθήκες δράσης του χρησιμοποιούμενου ενζύμου (pH 7,0 και θερμοκρασία 37°C) με βάση τη βιβλιογραφία, σε δώδεκα (12) σειρές ενζυμικών αντιδράσεων.

Κατά τη μελέτη της επίδρασης της περιεκτικότητας του υποστρώματος σε λακτόζη, παρατηρήθηκε ότι για τιμή ενζυμικής ενεργότητας ίση με 0,013 και 0,052 U/mL ο βαθμός απόδοσης σε GOS αυξάνεται όσο αυξάνεται η περιεκτικότητα του υποστρώματος σε λακτόζη, μέχρι και την περιεκτικότητα σε λακτόζη 14% κ.ό., ενώ σε υπόστρωμα με περιεκτικότητα σε λακτόζη 17% κ.ό., ο βαθμός απόδοσης μειώνεται εμφανίζοντας παρόμοια τιμή με αυτή για περιεκτικότητα σε λακτόζη 9% κ.ό. Για τιμή ενεργότητας ενζύμου ίση με 0,026 U/mL παρατηρήθηκε ότι με αύξηση της περιεκτικότητας υποστρώματος σε λακτόζη, ο μέγιστος βαθμός απόδοσης σε GOS μειώνεται.

Η μέγιστη απόδοση σε GOS επιτεύχθηκε με χρήση β-γαλακτοζιδάσης ενζυμικής ενεργότητας 0,052 U/mL για κάθε τιμή περιεκτικότητας ορού σε λακτόζη, εκτός από την περίπτωση 3,5 % κ.ό., για την οποία παρατηρείται μέγιστος βαθμός απόδοσης σε GOS για ενεργότητα ενζύμου 0,026 U/mL (23,7±3,05). Ακόμη, για περιεκτικότητα του υποστρώματος σε λακτόζη ίση με 9 και 17% κ.ό., παρατηρήθηκε ότι η σχέση μεταξύ της ενεργότητας του ενζύμου και του χρόνου επίτευξης του μέγιστου βαθμού απόδοσης ήταν αντιστρόφως ανάλογη.

Στη συνέχεια μελετήθηκε η επίδραση της τιμής pH του υποστρώματος στο βαθμό απόδοσης της ενζυμικής αντίδρασης σε GOS, σε ένα εύρος τιμών pH του υποστρώματος από 4,0 έως 7,0 και για περιεκτικότητα του υποστρώματος σε λακτόζη 3,5% κ.ό., ενζυμική ενεργότητα 0,026 U/mL, η οποία και επιλέχθηκε ως μέση τιμή ενζυμικής ενεργότητας, δεδομένου ότι σε ενζυμική ενεργότητα 0,013 U/mL δεν παρατηρήθηκε σημαντική απόδοση της ενζυμικής αντίδρασης. Τα αποτελέσματα στο μελετώμενο εύρος τιμών pH του υποστρώματος επιβεβαίωσαν τη βιβλιογραφικά βέλτιστη τιμή pH δράσης του ενζύμου (7,0) εμφανίζοντας

μέγιστο βαθμό απόδοσης σε GOS 23,7±3,05% μετά από 90 min, ενώ για τιμή pH κοντά στο 4,0 το ένζυμο δεν δύναται να καταλύσει καμία από τις δύο αντιδράσεις, δηλαδή την υδρόλυση ή την τρανσγαλακτοζυλίωση.

Από τη μελέτη της επίδρασης της θερμοκρασίας της ενζυμικής αντίδρασης στο βαθμό απόδοσης σε GOS, στο εύρος θερμοκρασιών από 37 έως 55°C, για περιεκτικότητα του υποστρώματος σε λακτόζη 14% κ.ό., τιμή pH 7,0 και ενζυμική ενεργότητα 0,052 U/mL, επιβεβαιώθηκε ότι, στους 37°C εμφανίζεται ο μέγιστος βαθμός απόδοσης σε GOS (37,0±1,06% μετά από 120 min), ενώ στη θερμοκρασία των 45°C το ένζυμο τείνει να καταλύει περισσότερο αντιδράσεις υδρόλυσης παρά ολιγομερισμού (τελική συγκέντρωση μονοσακχαριτών 10,1±0,42%, 12,9±0,45% και 3,51±0,1% κ.ό. για τους 37,45 και 55°C, αντίστοιχα). Στους 55°C, παρατηρήθηκε μικρότερη τιμή του μέγιστου βαθμού απόδοσης σε GOS σε σχέση με την αντίστοιχη τιμή για τους 37°C, υποδηλώνοντας ότι το ένζυμο σε θερμοκρασία μεγαλύτερη από τους 45°C εμφανίζει μειωμένη δραστικότητα και θερμοσταθερότητα.

Τέλος, μελετήθηκε η επίδραση της παρουσίας των λοιπών συστατικών του υποστρώματος πλέον της λακτόζης (πρωτεΐνες-άλατα) στην απόδοση της ενζυμικής αντίδρασης. Παρατηρήθηκε ότι η παρουσία αλάτων στο μελετώμενο σύστημα δρα ως υποκινητής για τη δράση του χρησιμοποιούμενου ενζύμου, αφού σημειώθηκαν μέγιστοι βαθμοί απόδοσης σε GOS 37,0±1,06% και 18,7±0,88% για τις περιπτώσεις όπου χρησιμοποιήθηκε ανεπεξέργαστος ορός και πρότυπο διάλυμα λακτόζης, αντίστοιχα. Η παρουσία των πρωτεϊνών ορού στο αντιδρών σύστημα φάνηκε να έχει θετική επίδραση στη δράση του ενζύμου, γεγονός που χρήζει περαιτέρω μελέτης αφού δεν υπάρχει καμία σχετική βιβλιογραφική αναφορά.

Με βάση τα παραπάνω πειράματα προσδιορίστηκαν οι βέλτιστες συνθήκες για την αντίδραση παραγωγής GOS από λακτόζη του όξινου ορού μέσω βιοκατάλυσης με β-γαλακτοζιδάση από τον *K. Lactis*. Ο μέγιστος βαθμός απόδοσης σε GOS (37,0±1,06%, σε 120 min) επιτεύχθηκε σε υπόστρωμα όξινου ορού περιεκτικότητας 14% κ.ό. σε λακτόζη και τιμή pH 7,0, σε θερμοκρασία 37°C και ενεργότητα ενζύμου 0,052 U/mL.

Στη συνέχεια, επιλέχθηκε η περαιτέρω ανάλυση ορισμένων δειγμάτων σε σύστημα HPAEC-PAD. Για κάθε ένα από τα μελετώμενα δείγματα επιβεβαιώθηκε η ύπαρξη γαλακτόζης και γλυκόζης, ως των μόνων μονοσακχαριτών του αντιδρώντος συστήματος, των δισακχαριτών 6-γαλακτοβιόζης και λακτόζης, ενώ παράλληλα ανιχνεύθηκαν από τρεις έως τέσσερις άγνωστες κορυφές που αντιστοιχούν σε ολιγοσακχαρίτες με βαθμό πολυμερισμού 2 ή 3.

Τα αποτελέσματα της παρούσας διπλωματικής εργασίας ολοκληρώθηκαν με σύγκρισή τους με προηγούμενα πειραματικά δεδομένα που αφορούσαν στη μελέτη της επίδρασης αντίστοιχων παραγόντων στη ενζυμική μετατροπή της λακτόζης του όξινου ορού σε GOS με χρήση β-γαλακτοζιδάσης από τον μικροοργανισμό *Aspergillus oryzae*. Από την παραπάνω σύγκριση συμπεραίνεται ότι, με χρήση του ενζύμου από τον *K. lactis* επιτυγχάνεται αύξηση του μέγιστου βαθμού απόδοσης σε GOS κατά 15 ποσοστιαίες μονάδες (60% αύξηση), μείωση του απαιτούμενου χρόνου επίτευξής του κατά 4 ώρες, ενώ παράλληλα απαιτείται και χαμηλότερη ενεργότητα ενζύμου για την επίτευξη της μέγιστης απόδοσης σε GOS, χωρίς όμως αυτό να συνεπάγεται και μείωση του κόστους της διεργασίας λόγω της διαφορετικού τρόπου παραγωγής του εκάστοτε ενζύμου (ενδο- και εξωκυτταρικά) που δύναται να αυξήσει την τελική τιμή του ενζυμικού παρασκευάσματος.

Valorization of yoghurt acid whey for the production of galactooligosaccharides with the use of biocatalysts

The present diploma thesis aims to study the utilization of yoghurt acid whey, via the production of galactooligosaccharides (GOS) from the containing lactose. The enzyme of β-galactosidase from *Kluyveromyces lactis* was used as biocatalyst.

Initially, the enzyme activity of β-galactosidase from the microorganism *K. lactis* was determined and found to be equal to 13.15 (±0.57) U/mL. The quantification of the results of the enzymatic reactions was performed with analysis of the samples with High-Performance Liquid Chromatography (HPLC) using refractive index detector. The reference curves of lactose, galactose and raffinose were developed, which were used for the quantification of monosaccharides, disaccharides and the formed oligosaccharides, respectively. Due to the low separating ability of the HPLC system to analyze molecules of the same polymerization degree with different monomers or/and glycosidic bonds, some samples were also analyzed with High Performance Anion Exchange Chromatography with Pulsed Amperometric Detection (HPAEC-PAD), for the complete identification of all the monosaccharides, the disaccharides and the formed oligosaccharides.

The study of the effect of lactose concentration of the substrate and the enzyme activity on the enzymic conversion of acid whey lactose to GOS were the key factors studied in the present study. For this purpose, different combinations of acid whey lactose content of 3.5%, 9%, 14% and 17% w/v and enzyme activity of 0.013, 0.026 and 0.052 U/mL, in the literature optimal conditions of enzyme (pH 7.0 and temperature 37°C) were used, in twelve (12) series of enzyme reactions.

While studying the effect of acid whey lactose content on the % GOS yield, it was observed that for enzyme activity of 0.013 and 0.052 U/mL, maximum % GOS yield increased with the increase in acid whey lactose content up to 14% w/v. In the case where acid whey lactose content of 17% w/v was used, maximum % GOS yield decreased, exhibiting similar value to that obtained when acid whey lactose content of 9% w/v was used. For enzyme activity of 0.026 U/mL, it was observed that by increasing the acid whey lactose content, the maximum % GOS yield decreased.

The maximum % GOS yield was achieved when the enzyme activity of the used β-galactosidase was 0.052 U/mL, regardless of the acid whey lactose content, except for the case of 3.5% w/v lactose, for which maximum % GOS yield was observed for enzyme activity equal to 0.026 U/mL (23.7 ± 3.05). Furthermore, for acid whey lactose content equal to 9 or 17% w/v, it was observed that the relation between the enzyme activity and the required time to achieve maximum % GOS yield was inversely proportional to the increase in the enzyme activity.

In addition, the effect of the pH value of the substrate on the % GOS yield of the enzymic reaction was studied, in the pH range between 4.0 and 7.0, for 3.5% w/v acid whey lactose content, and enzyme activity of 0.026 U/mL, which was selected as an average value of enzyme activity, given that in enzyme activity of 0.013 U/mL no significant % GOS yield was observed. Results confirmed the bibliographical proposed optimum pH value for the enzyme activity (7.0), exhibiting a maximum % GOS yield of 23.7±3.05% after 90 min, while

for pH value close to 4.0 the enzyme was not capable to catalyze any of the two reactions, either hydrolysis or transgalactosylation.

The effect of enzyme reaction temperature on the % GOS yield was tested in the temperature range between 37 and 55°C, for 14% w/v lactose content, pH value of the substrate 7.0 and enzyme activity 0.052 U/mL. It was confirmed that the maximum % GOS yield (37.0±1.06% after 120 min) was achieved at 37°C, while at 45°C the enzyme tends to catalyze hydrolysis reactions more than oligomerization (final concentration of monosaccharides 10.1±0.42%, 12.9±0.45% and 3.51±0.1% w/v for the temperature of 37, 45 και 55°C, respectively). Regarding the reaction which was conducted at 55°C, a lower value of the maximum % GOS yield was observed than the corresponding one at 37°C, indicating that the enzyme in temperatures greater than 45°C exhibits reduced activity and thermostability.

Finally, the effect of the presence of other components than lactose (proteins-minerals) on the enzymic reaction yield was studied. It was observed that the activity of the enzyme used is likely stimulated by them, since maximum % GOS yield of 37.0±1.06% and 18.7±0.88% was observed in the cases where non-treated acid whey and standard lactose solution was used, respectively. The presence of whey proteins in the reaction system appeared to have a positive effect on the enzyme activity, which needs further investigation since there are no previous studies.

Based on the above experiments, the reaction conditions for the production of GOS from acid whey lactose by β-galactosidase biocatalysis from *K. lactis* were determined. The maximum % GOS yield (37.0±1.06%, after 120 min) was achieved using acid whey lactose content of 14% w/v at pH value of 7.0, reaction temperature of 37°C and enzyme activity equal to 0.052 U/mL.

The analysis of the some of the above samples in HPAEC-PAD system was performed. For each one of the studied samples, the presence of galactose and glucose, as the only present monosaccharides in the reaction system and, 6-galactobiose and lactose as disaccharides was confirmed, while at the same time three to four unknown peaks that correspond to oligosaccharides with a polymerization degree of 2 or 3 were detected.

The results of the present thesis were compared to previous experimental data related to the effect of corresponding factors on the enzymatic conversion of acid whey lactose through the use of the enzyme of β-galactosidase from *Aspergillus oryzae*. The use of the enzyme from *K. lactis* led to a 15 percentage units (60% increase) in the GOS yield and a 4-hour reduction of the required time to achieve maximum GOS yield. At the same time, less enzyme activity is required, but this is not implies a reduction of the process cost, due to the fact that the different way of enzyme production (intracellularly and extracellularly) may increase the final cost of the enzyme preparation.

Περιεχόμενα

Πρόλογος…….. i
Περίληψη……. iii
Abstract……..... v
Περιεχόμενα……. vii

Εισαγωγή……. 1

Κεφάλαιο 1ο: Όξινος ορός: από παραπροϊόν σε χρήσιμο συστατικό…….. 5
1.1 Εισαγωγή…… 5
1.2 Συστατικά του ορού…… 6
1.2.1 Λακτόζη…….. 6
1.2.2 Πρωτεΐνες ……... 7
1.2.3 Άλατα…….. 7
1.2.4 Λίπη……. 7
1.2.5 Βιταμίνες……. 7
1.3 Η λακτόζη ως πρώτη ύλη για την παραγωγή άλλων προϊόντων..……. 8
1.3.1 Εισαγωγή…… 8
1.3.2 Η λακτόζη του ορού……... 9
1.3.3 Κρυστάλλωση λακτόζης……. 9
1.3.4 Εφαρμογές λακτόζης……. 11
1.3.5 Μειονεκτήματα – Δυσανεξία της λακτόζης……... 11
1.4 Αξιοποίηση του ορού γιαουρτιού……..……. 12

Κεφάλαιο 2ο: Βιοτεχνολογική αξιοποίηση της λακτόζης ……..…… 15
2.1 Εισαγωγή……...……. 15
2.2 Παραγωγή β-γαλακτοζιδάσης……. 15
2.2.1 Παραγωγή β-γαλακτοζιδάσης από βακτήρια……..……. 16
2.2.2 Παραγωγή β-γαλακτοζιδάσης από ζυμομύκητες & ευρωτομύκητες…... 16
2.2.3 Παραγωγή β-γαλακτοζιδάσης από φυτά…….. 17
2.3 Αντίδραση υδρόλυσης……...……. 17
2.4 Αντίδραση τρανσγαλακτοζυλίωσης……...……. 18
2.5 β-γαλακτοζιδάση από *Aspergillus oryzae*……...…… 19
2.6 β-γαλακτοζιδάση από *Kluyveromyces lactis*…….……...….. 20
2.7 Βιομηχανική αξιοποίηση της β-γαλακτοζιδάσης……..... 21

Κεφάλαιο 3ο: Οι γαλακτοολιγοσακχαρίτες ως προϊόντα βιοκαταλύσεων…. 23
3.1 Εισαγωγή…… 23
3.2 Παραγωγή γαλακτοολιγοσακχαριτών (GOS)……..…….. 23
3.2.1 Ενζυμική παραγωγή GOS και παράγοντες που την επηρεάζουν…… 24
3.2.1.1 Παραγωγή GOS από ολόκληρα κύτταρα……...…..……. 26
3.2.1.2 Παραγωγή GOS από ελεύθερη β-γαλακτοζιδάση……..…....… 27
3.2.1.3 Παραγωγή GOS από ακινητοποιημένη β-γαλακτοζιδάση……..... 27
3.3 Απομόνωση και καθαρισμός γαλακτοολιγοσακχαριτών…...……..... 28
3.4 Παγκόσμια αγορά GOS…….**.....** 28
3.5 Εμπορικά διαθέσιμοι GOS…….. 31
3.6 Τα οφέλη των GOS στην υγεία του ανθρώπου……**...** 31
3.7 Υφιστάμενες επιστημονικές μελέτες της ενζυμικής βιομετατροπής της λακτόζης σε GOS…….. 32

Κεφάλαιο 4ο: Πειραματικός σχεδιασμός - Υλικά και μέθοδοι…….……. 37
4.1 Σκοπός και στόχοι……. 37
4.2 Υλικά-Αντιδραστήρια…… 38
4.3 Μέθοδοι……. 39
4.3.1 Παραλαβή του όξινου ορού και ρύθμιση της περιεκτικότητας της περιεχόμενης λακτόζης…… 39
4.3.2 Απομάκρυνση των πρωτεϊνών…… 40
4.4 Πειραματική διαδικασία……. 41
4.5 Αναλύσεις……... 42
4.5.1 Μέτρηση της ενζυμικής ενεργότητας της β-γαλακτοζιδάσης……. 42
4.5.2 Ηλεκτροφόρηση Πρωτεϊνών σε Αποδιατακτικές Συνθήκες σε Πήκτωμα Πολυακρυλαμίδης (Sodium Dodecyl Sulfate - Polyacrylamide Gel Electrophoresis, SDS-PAGE)…….. 43
4.5.3 Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης (High Performance Liquid Chromatograpgy, HPLC)……. 44
4.5.4 Χρωματογραφία Ανιονεναλλαγής Υψηλής Απόδοσης με Παλμικό Αμπερομετρικό Ανιχνευτή (High Performance Anion-Exchange Chromatography - Pulsed Amperometric Detection, HPAEC-PAD)…….. 44
4.6 Σχεδιασμός πειραμάτων……. 45
4.7 Στατιστική επεξεργασία αποτελεσμάτων……. 47

Κεφάλαιο 5ο: Αποτελέσματα και συζήτηση……. 49
5.1 Πρωτογενείς μετρήσεις……... 49
5.1.1 Χρόνοι έκλουσης σακχάρων στο σύστημα HPLC-RI…… 49
5.1.2 Καμπύλες αναφοράς γαλακτόζης, λακτόζης και ραφινόζης……... 51
5.1.2.1 Καμπύλη αναφοράς γαλακτόζης…….. 51

5.1.2.2 Καμπύλη αναφοράς λακτόζης…….. 51

5.1.2.3 Καμπύλη αναφοράς ραφινόζης……. 52

5.1.2.4 Μέτρηση της ενζυμικής ενεργότητας της β-γαλακτοζιδάσης από το μικροοργανισμό *K. Lactis*……..……. 53

5.2 Αποτελέσματα ενζυμικών αντιδράσεων……. 53

5.2.1 Επίδραση της συγκέντρωσης της λακτόζης στην ενζυμική διεργασία μετατροπής της λακτόζης του όξινου ορού σε GOS…… 53

5.2.2 Επίδραση της ενεργότητας της β-γαλακτοζιδάσης στην ενζυμική διεργασία μετατροπής της λακτόζης του όξινου ορού σε GOS…… 60

5.2.3 Επίδραση της τιμής του pH στην ενζυμική διεργασία μετατροπής της λακτόζης του όξινου ορού σε GOS…….. 67

5.2.4 Επίδραση της θερμοκρασίας στην ενζυμική διεργασία μετατροπής της λακτόζης του όξινου ορού σε GOS…….. 69

5.2.5 Επίδραση των συστατικών του υποστρώματος στην ενζυμική διεργασία μετατροπής της λακτόζης του όξινου ορού σε GOS…… 71

5.2.6 Σύνοψη των αποτελεσμάτων……... 73

5.3 Ανάλυση των δειγμάτων σε σύστημα HPLC και HPAEC-PAD……..…. 75

5.4 Συγκριτικά αποτελέσματα της ενζυμικής αντίδρασης με ένζυμο β-γαλακτοζιδάσης από *K. lactis* σε σύγκριση με τον *A. oryzae*…….…… 79

Συμπεράσματα……. 83

Βιβλιογραφία……... 89

Εισαγωγή

Το στραγγιστό γιαούρτι, διεθνώς γνωστό ως «Greek Yogurt» έχει γίνει δημοφιλές στην παγκόσμια αγορά τα τελευταία χρόνια, έχοντας καταλάβει περισσότερο από το 50% του μεριδίου της αγοράς γιαουρτιού (Conick 2015). Προτιμάται από τους καταναλωτές λόγω της υψηλότερης περιεκτικότητας σε πρωτεΐνες σε σύγκριση με τους άλλους τύπους γιαουρτιού.

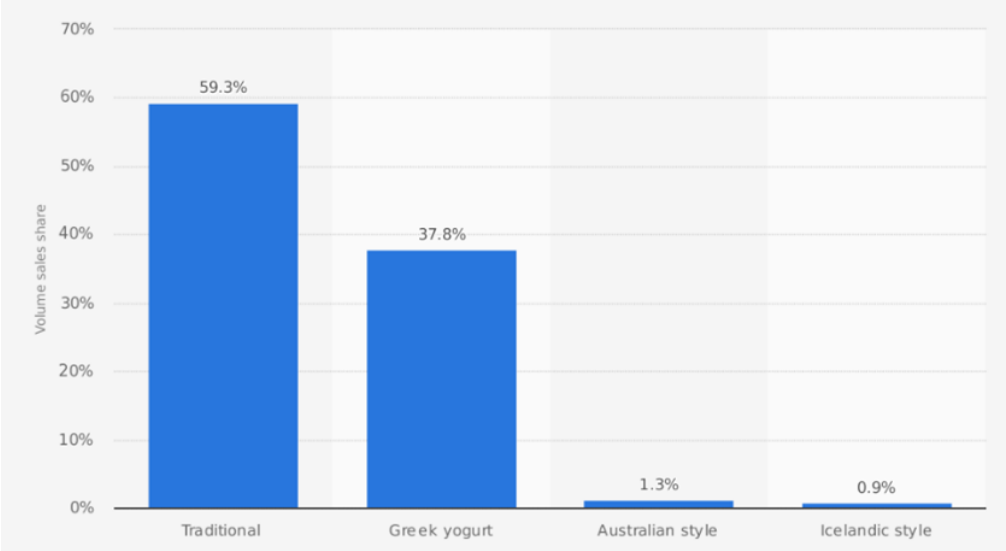
Η κύρια διαφορά του στραγγιστού γιαουρτιού από τους άλλους τύπους (σετ, ανακατεμένο, πόσιμο, κ.λπ.) αφορά στην παραγωγική του διαδικασία, καθώς περιλαμβάνει ένα στάδιο στο οποίο το πήγμα αφήνεται να στραγγίσει σε σακούλες υφασμάτων μέσω της βαρύτητας, για παραγωγή μικρής κλίμακας, ή με φυγοκέντρηση και διήθηση σε μεμβράνες, για βιομηχανική παραγωγή, μέχρις ότου τα συνολικά στερεά που παραμένουν στο γιαούρτι είναι τα επιθυμητά (Kilara & Chandan 2013). Το νερό που αφαιρείται σε αυτό το στάδιο της παραγωγικής διαδικασίας είναι γνωστό ως όξινος ορός γιαουρτιού και ισούται περίπου με τα δύο τρίτα της συνολικής ποσότητας γάλακτος που χρησιμοποιείται κατά την παραγωγική διαδικασία (Kyle & Amamcharla 2016).

Μέχρι πρότινος, ο ορός γιαουρτιού χαρακτηριζόταν ως απόβλητο και αποβαλλόταν στον ωκεανό ή στις εγκαταστάσεις της επεξεργασίας αστικών λυμάτων (Smithers 2015). Σήμερα, η μη επεξεργασμένη διάθεση όξινου ορού γιαουρτιού απαγορεύεται μέσω αυστηρών περιβαλλοντικών κανονισμών (Smithers 2008, 2015), καθώς ο ορός παρουσιάζει υψηλές απαιτήσεις σε Βιοχημικά Απαιτούμενο Οξυγόνο (Biochemical Oxygen Demand-BOD) και Χημικά Απαιτούμενο Οξυγόνο (Chemical Oxygen Demand-COD), οι οποίες ξεπερνούν τα 35.000 ppm και τα 60.000 ppm, αντίστοιχα (Siso 1996, Mawson 1994, Smithers 2015). Ως αποτέλεσμα, η απόρριψη του όξινου ορού στο περιβάλλον επηρεάζει τη φυσική και χημική σύνθεση του εδάφους, με αποτέλεσμα να μειώνεται η απόδοση της ευφορίας του εδάφους. Ακόμη, η απόρριψη του όξινου ορού σε ρεύματα νερού μειώνει την υδρόβια ζωή, καθώς εξαντλείται το διαλυμένο οξυγόνο (Kosseva et al. 2009).

Σύμφωνα με διαθέσιμα στατιστικά στοιχεία, εκτιμάται ότι το 33% της παγκόσμιας γαλακτοβιομηχανίας αφορά στην παραγωγή γιαουρτιού, με τον εκτιμώμενο όγκο όξινου ορού που παραμένει μετά τη διάρκεια της παραγωγικής διαδικασίας να ανέρχεται στο 85-90% του όγκου του γάλακτος που χρησιμοποιήθηκε για την παραγωγή στραγγιστού γιαουρτιού. Το 2010 η παγκόσμια παραγωγή στραγγιστού γιαουρτιού ανήλθε σε 165 εκατομμύρια tn, με το 68% να παράγεται στις χώρες της Ευρωπαϊκής Ένωσης (Darade & Ghodake 2012). Επιπρόσθετα, η παγκόσμια ζήτηση του στραγγιστού γιαουρτιού, και συνεπώς και η παραγωγή όξινου ορού αυξάνεται περίπου κατά 2% ετησίως.

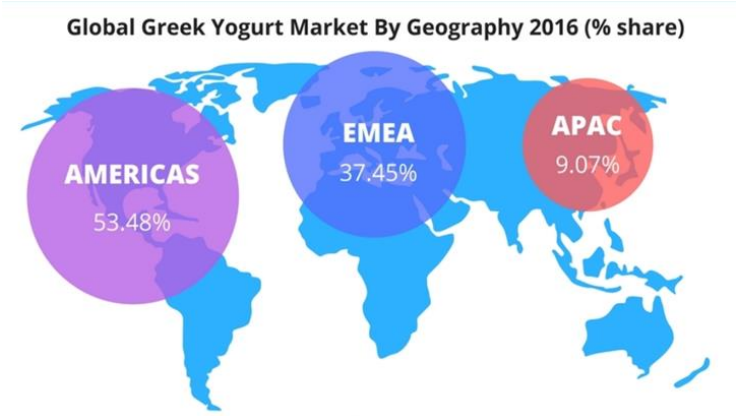
Με την αύξηση της ζήτησης του στραγγιστού γιαουρτιού, αυξάνεται παράλληλα η ποσότητα του όξινου ορού που απορρίπτεται από τη βιομηχανία, καθώς για κάθε kg παραγόμενου προϊόντος στραγγιστού γιαουρτιού, απορρίπτονται περίπου 2-3 kg όξινου ορού (Erickson 2017).

Η μεγαλύτερη αγορά του στραγγιστού γιαουρτιού είναι οι ΗΠΑ. Σύμφωνα με το Υπουργείο Γεωργίας των ΗΠΑ, περίπου 771.000 tn στραγγιστού γιαουρτιού παράχθηκαν στις ΗΠΑ το 2015, αντιπροσωπεύοντας σχεδόν το 40% της αγοράς γιαουρτιών, όταν το 2004 το γιαούρτι «ελληνικού τύπου» αποτελούσε μόνο το 1-2% της αγοράς γιαουρτιού (Erickson 2017). Στο παρακάτω διάγραμμα παρουσιάζεται η προτίμηση των καταναλωτών στο στραγγιστό γιαούρτι, συγκριτικά με τους υπόλοιπους τύπους γιαουρτιού, με βάση τα στατιστικά στοιχεία του 2017 για τις ΗΠΑ (Gaille 2018).



Εικόνα 1. *Προτίμηση των καταναλωτών στο στραγγιστό γιαούρτι συγκριτικά με γιαούρτια άλλου τύπου στις ΗΠΑ το 2017 (Πηγή: IRI, USDEC, Statista 2018)*

Οι ερευνητές της Technavio ανέλυσαν την παγκόσμια αγορά στραγγιστού γιαουρτιού παγκοσμίως στα ακόλουθα τμήματα: την Αμερική, την Ευρώπη και την Ασία (Εικόνα 2). Η αγορά γιαουρτιού «ελληνικού τύπου» στην Αμερική αυξάνεται λόγω της αυξανόμενης ευαισθητοποίησης των καταναλωτών στο θέμα της υγείας μέσω της κατανάλωσης τροφίμων. Το στραγγιστό γιαούρτι θεωρείται ότι εμφανίζει υψηλότερη διατροφική αξία σε σχέση με άλλους τύπους γιαουρτιού, λόγω της υψηλής συγκέντρωσής του σε πρωτεΐνες ως αποτελέσμα της διαδικασίας στράγγισής του. Αυτός ο τύπος γιαουρτιού συνέβαλε πάρα πολύ στην ανάπτυξη της συνολικής βιομηχανίας παρασκευής γιαουρτιού στην Αμερική. Άλλοι παράγοντες, όπως η εισαγωγή νέων γεύσεων και η ελκυστική συσκευασία, συνέβαλαν επίσης στο να γίνει η Αμερική η μεγαλύτερη αγορά στραγγιστού γιαουρτιού. Η Ευρώπη είναι η δεύτερη μεγαλύτερη αγορά στραγγιστού γιαουρτιού, η οποία κυριαρχεί στην παγκόσμια αγορά λόγω των καταναλωτών της, οι οποίοι έχουν γίνει πιο επιφυλακτικοί στην κατανάλωση τροφίμων, επιλέγοντας τρόφιμα με βάση το θρεπτικό τους περιεχόμενο. Η αγορά στραγγιστού γιαουρτιού στην Ασία και την Αυσταλία, αν και είναι μικρότερη από τις άλλες δύο περιοχές, αυξάνεται σήμερα με πολύ ταχύ ρυθμό, δεδομένου του αυξημένου πληθυσμού που καλείται να προσεγγίσει.



Εικόνα 1. Παγκόσμια αγορά στραγγιστού γιαουρτιού το 2016

Οι κορυφαίοι πωλητές της παγκόσμιας αγοράς στραγγιστού γιαουρτιού είναι οι Chobani, Dannon, Fage και η General Mills, όπου κάθε μια, έχει κερδίσει ένα μεγάλο μερίδιο αγοράς, αλλά και την αντίστοιχη αναγνωρισιμότητα (Maida 2017).

Η συνεχιζόμενη ανάπτυξη της αγοράς του γιαουρτιού «ελληνικού τύπου», καθώς και η καινοτομία του κλάδου, συμβάλλουν στη συνεχή προώθηση της αγοράς του στραγγιστού γιαουρτιού. Νέες γεύσεις και καινοτόμα προϊόντα στραγγιστού γιαουρτιού ωθούν στην ανάπτυξη της ζήτησης και συνεπώς της αγορά του, με ένα ετήσιο προβλεπόμενο ρυθμό αύξησης περίπου ίσο με 1,9% στην επόμενη πενταετία.

Παρόλα αυτά, η αγορά του στραγγιστού γιαουρτιού οφείλει να έρθει αντιμέτωπη τόσο με τις οικονομικές αλλαγές του νοικοκυριού, όσο και με τις περιβαλλοντικές συνέπειες στην απόρριψη των αποβλήτων του, καθώς η ευαισθητοποίηση των καταναλωτών υπέρ της προστασίας του περιβάλλοντος δύναται να επηρεάσει άμεσα την αγορά οποιουδήποτε τρόφιμου. Κρίνεται λοιπόν επιτακτική η αξιοποίηση του όξινου ορού, μέσω καινοτόμων τεχνολογιών, με στόχο την παραγωγή νέων συστατικών ή/και προϊόντων, που θα βοηθήσουν στην ακόμη μεγαλύτερη άνθιση της αγοράς του στραγγιστού γιαουρτιού (Gaille 2018).

Η ανάγκη αυτή δημιούργησε και το βασικό στόχο της παρούσας διπλωματικής εργασίας. Συγκεκριμένα, θα μελετηθεί η αξιοποίηση της λακτόζης του όξινου ορού για την παραγωγή συστατικών υψηλής διατροφικής αξίας (γαλακτοολιγοσακχαρίτες), η οποία δυνητικά μπορεί να οδηγήσει και στη μείωση των αποβλήτων της βιομηχανίας γιαουρτιού, επιφέροντας ταυτόχρονα πρόσθετα κέρδη στη βιομηχανία μέσω της χρήσης σε ιδία προϊόντα ή/και διάθεσης των παραγόμενων συστατικών σε άλλες βιομηχανίες τροφίμων.

Αναλυτικότερα, στο πρώτο κεφάλαιο περιγράφεται ο όξινος ορός, που αποτελεί και τη βασική πρώτη ύλη για τα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία. Ο όξινος ορός συγκρίνεται με τους άλλους τύπους ορού (γλυκός, αλμυρός και ορός γάλακτος), και παράλληλα γίνεται αναφορά στα επιμέρους συστατικά του, και κυρίως στη λακτόζη. Στη συνέχεια, στο δεύτερο κεφάλαιο γίνεται αναφορά στο βασικό βιοτεχνολογικό εργαλείο που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα μελέτη για την αξιοποίηση του όξινου ορού. Ειδικότερα, περιγράφεται το ένζυμο της β-γαλακτοζιδάσης, οι μέθοδοι παραγωγής του και η χρήση του ως βιοκαταλύτης κατά τη μετατροπή της λακτόζης προς γαλακτοολιγοσακχαρίτες. Στο τρίτο

κεφάλαιο αναπτύσσονται οι τρόποι παραγωγής των γαλακτοολιγοσακχαριτών και η σημασία τους ως συστατικά υψηλής διατροφικής αξίας. Με βάση τα παραπάνω, στο τέταρτο κεφάλαιο παρουσιάζεται η μεθοδολογία που ακολουθήθηκε με σκοπό να εξεταστεί η μετατροπή της λακτόζης του όξινου ορού σε ολιγοσακχαρίτες, καθώς και οι παράγοντες που την επηρεάζουν. Η παρουσίαση και ο σχολιασμός των αποτελεσμάτων της παρούσας μελέτης γίνεται στο πέμπτο κεφάλαιο, και η εργασία ολοκληρώνεται με τα βασικά συμπεράσματα και μερικές προτάσεις για συνέχιση της έρευνας, βασιζόμενες σε παρατηρούμενες ελλείψεις και προβλήματα που εξήχθησαν τόσο από τη μελέτη αυτή όσο και από τη διαθέσιμη διεθνή βιβλιογραφία.

Κεφάλαιο 1ο

Όξινος ορός: από παραπροϊόν σε χρήσιμο συστατικό

1.1 Εισαγωγή

Ο ορός γιαουρτιού είναι ένα κίτρινο ημιδιαφανές υγρό (Jelen 2003) που αφορά στο μέρος του πήγματος που αποβάλλεται κατά την παραγωγική διαδικασία του στραγγιστού γιαουρτιού μετά τη στράγγιση του πήγματος (Panesar et al. 2007).

Στη γαλακτοβιομηχανία παράγονται τέσσερεις (4) τύποι ορού, ο όξινος, ο γλυκός, ο αλμυρός και ο ορός γάλακτος (Nishanthi et al. 2017). Ο όξινος ορός προκύπτει από τη ζύμωση του γάλακτος προς γιαούρτι ή νωπά τυριά, όπως τυρί κρέμας, Cottage, Tvorog, το Fromage frais και το τυρί Ricotta, με τιμή pH περίπου ίση με 4,2-5,0 (Tunick et al. 2008, Jelen 2003). Ο γλυκός ορός προέρχεται από την παραγωγή σκληρών και ημίσκληρων τυριών, όπως το τυρί Cheddar, με τιμή pH περίπου 6,0-6,5. Ο αλμυρός ορός αντιπροσωπεύει το 2 έως 5% του συνολικού ορού που παράγεται κατά τη διάρκεια της παρασκευής του τυριού Cheddar και άλλων τύπων τυριών. Ο ορός γάλακτος αντιπροσωπεύει το 90% του όγκου της συνολικής παραγωγής και το 50% των στερεών συστατικών που περιέχονται στο γάλα, ενώ χρησιμοποιείται κυρίως από τη βιομηχανία για παραγωγή πρωτεϊνικών συμπληρωμάτων.

Οι δύο συνηθέστεροι και σε μεγαλύτερη παραγωγή τύποι ορού είναι ο γλυκός και ο όξινος ορός. Οι κύριες διαφορές μεταξύ των δύο τύπων ορού είναι η περιεκτικότητα σε ανόργανες ουσίες, η οξύτητα και το κλάσμα πρωτεϊνών που προέρχεται από τον ορό (Πίνακας 1.1, Jelen 2008). Η ιδιαίτερα υψηλή τιμή της οξύτητας του όξινου ορού προκύπτει από την μετατροπή μέρους της λακτόζης σε γαλακτικό οξύ από βακτήρια του γαλακτικού οξέος αλλά και από προσθήκη διαφόρων μέσων οξίνισης. Επιπλέον, ο όξινος ορός έχει υψηλή συγκέντρωση γαλακτόζης λόγω της διάσπασης της λακτόζης σε γλυκόζη και γαλακτόζη, και παράλληλα έχει και υψηλότερη περιεκτικότητα σε ασβέστιο, λόγω του χαμηλού του pH, και της διαλυτοποίησης του καλλοειδούς ασβεστίου των μικυλλίων καζεΐνης (Jelen 2003).

Αν και ο γλυκός ορός κατέχει αξιόλογη θέση ως προς την αξιοποίηση του στη βιομηχανία τροφίμων, ο όξινος ορός δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί άμεσα λόγω του υψηλού επιπέδου σε βιοχημικά απαιτούμενο οξυγόνο (BOD) και της χαμηλής τιμής pH (συνήθως μικρότερης του 4,5). Για το λόγο αυτό, ο όξινος ορός ακόμη μελετάται ως προς τις προοπτικές αξιοποίησής του, ενώ έχει αρχίσει να αναδύεται μια νέα προοπτική που σχετίζεται με την αξιοποίηση των συστατικών του, τα οποία εμφανίζουν αξιόλογες φυσικές, χημικές, διατροφικές και βιολογικές ιδιότητες(Smithers 2015). Η αξιοποίηση των συστατικών του ορού σχετίζεται με την απομόνωση και τη χρήση τους ως συστατικά τροφίμων ή άλλων προϊόντων, αλλά και ως πρώτη ύλη για την παραγωγή άλλων συστατικών, όπως είναι οι γαλακτοολιγοσακχαρίτες, οι οποίοι ανήκουν στην κατηγορία των πρεβιοτικών συστατικών (prebiotics). Αυτός ο τομέας αξιοποίησης είναι πολλά υποσχόμενος αλλά βρίσκεται ακόμα σε ερευνητικό στάδιο.

Πίνακας 1.1 *Ανάλυση σύστασης γλυκού και όξινου ορού*

Συστατικά	Γλυκός ορός	Όξινος ορός
Ολικά στερεά ($g \cdot L^{-1}$)	38,7±0,75	39,1±1,17
Γλυκόζη ($g \cdot L^{-1}$)	0,30±0,02	Δεν ανιχνεύτηκε
Γαλακτόζη ($g \cdot L^{-1}$)	0,43±0,05	1,10±0,09
Λακτόζη ($g \cdot L^{-1}$)	38,0±0,68	38,0±1,08
Συνολική πρωτεΐνη ($g \cdot L^{-1}$)	5,56±0,08	3,02±0,03
Πρωτεΐνη ορού ($g \cdot L^{-1}$)	5,11±0,07	2,42±0,70
Καζεΐνη ($g \cdot L^{-1}$)	0,45±0,09	0,60±0,18
NPN ($g \cdot L^{-1}$)	0,71±0,02	1,63±0,05
Τέφρα ($g \cdot L^{-1}$)	4,33±0,01	7,42±0,01
Γαλακτικό οξύ ($g \cdot L^{-1}$)	0,50±0,01	8,11±0,08
Λίπη ($g \cdot L^{-1}$)	0,47±0,01	0,18±0,01
Na^+ (Mm)	16,5±0,35	18,6±0,25
NH_{4^+} (Mm)	2,41±0,05	10,4±0,25
K^+ (Mm)	29,6±0,95	45,2±0,59
Mg^{2+} (Mm)	2,81±0,09	4,90±0,09
Ca^{2+} (Mm)	8,44±0,22	25,5±0,70
Cl^- (Mm)	21,5±0,53	42,6±0,75
NO_{3^-} (Mm)	0,81±0,04	0,33±0,02
PO_4^{2-} (Mm)	8,35±0,19	17,6±0,37
SO_4^{2-} (Mm)	1,14±0,18	0,64±0,02

1.2 Συστατικά του ορού

Ο ορός είναι ένα πολυσύνθετο διάλυμα που περιλαμβάνει πολλά από τα διαλυτά συστατικά του γάλακτος, ενώ κύρια συστατικά του είναι η λακτόζη, οι πρωτεΐνες, τα διάφορα άλατα, τα λίπη και οι βιταμίνες. Στις επόμενες ενότητες αναλύονται τα βασικά συστατικά του όξινου ορού.

1.2.1 Λακτόζη

Η λακτόζη είναι το κύριο συστατικό του όξινου ορού, αποτελώντας περίπου το 70% των ολικών στερεών του, για το οποίο θα γίνει εκτενής αναφορά σε επόμενη παράγραφο. Πρόκειται για ένα δισακχαρίτη που αποτελείται από ένα μόριο γλυκόζης και ένα μόριο γαλακτόζης, και αποτελεί σημαντική πηγή διατροφικής ενέργειας, ενισχύοντας την εντερική απορρόφηση του ασβεστίου των τροφίμων. Το ένζυμο της λακτάσης, είναι το ένζυμο που είναι απαραίτητο για τη διάσπαση της λακτόζης σε γλυκόζη και γαλακτόζη, ενώ η έλλειψη του ανωτέρω ενζύμου προκαλεί τη λεγόμενη δυσανεξία στη λακτόζη, με αποτέλεσμα να μην μπορούν να απορροφηθούν από την εντερική οδό η γλυκόζη και η γαλακτόζη (De Wit 2001).

1.2.2 Πρωτεΐνες

Οι πρωτεΐνες του ορού χωρίζονται σε δύο κατηγορίες, στης κύριας και της δευτερευούσης αξίας πρωτεΐνες. Οι κύριες πρωτεΐνες ορού του γάλακτος είναι η β-γαλακτογλοβουλίνη, σε ποσοστό 65%, η α-γαλακτοαλβουμίνη, σε ποσοστό 25% και η αλβουμίνη ορού, σε ποσοστό 8%, επί τη βάσει των συνολικών πρωτεϊνών ορού. Στις δευτερευούσης αξίας πρωτεΐνες εντάσσονται τα γλυκομακροπεπτίδια (Glycomacropeptides, GMP), η αλβουμίνη ορού βοοειδών, η λακτοφερρίνη, η ανοσοσφαιρίνη και οι φωσφολιποπρωτεΐνες (Macwan et al. 2016). Οι πρωτεΐνες του ορού έχουν υψηλή βιολογική αξία (Biological value, BV=110) (Fox et al. 2015), είναι θερμοευαίσθητες και μπορούν να καθιζάνουν με θερμική επεξεργασία υπό κατάλληλες συνθήκες pH και ιοντικής ισχύος. Η ιδιότητα αυτή χρησιμοποιείται για την παραγωγή γαλακτοαλβουμίνης, η οποία παράγεται με θερμική καθίζηση των πρωτεϊνών του ορού και αποτελεί μίγμα μετουσιωμένων πρωτεϊνών α-γαλακτοαλβουμίνης και β-γαλακτογλοβουλίνης (Chiu & Etzel 2006).

1.2.3 Άλατα

Το τρίτο κύριο συστατικό του όξινου ορού είναι τα άλατα. Η σύσταση τόσο του όξινου, όσο και του γλυκού ορού σε άλατα σχετίζεται με τη διαδικασία παρασκευής τους. Γενικά, ο όξινος ορός έχει υψηλότερη περιεκτικότητα σε φωσφόρο, ασβέστιο, ψευδάργυρο, σίδηρο και χαλκό σε σχέση με το γλυκό ορό, ενώ σχετικά με τις περιεκτικότητες σε κάλιο, μαγνήσιο, νάτριο, μαγγάνιο και αλουμίνιο, η διαφοροποίηση μεταξύ των δύο τύπων ορού δεν είναι σημαντική.

1.2.4 Λίπη

Η περιεκτικότητα του ορού σε λιπαρά αμέσως μετά τον διαχωρισμό του ορού από το πήγμα του γιαουρτιού κυμαίνεται συνήθως από 0,5-1,0% κ.β., ανάλογα με την περιεκτικότητα σε λιπαρά του γάλακτος που χρησιμοποιήθηκε και της αποδοτικότητας της διεργασίας. Συνήθως, το λίπος ανακτάται κατά τη διεργασία της φυγοκέντρησης και πηγαίνει στη φάση του προϊόντος (τυρί ή γιαούρτι) ή αξιοποιείται διαφορετικά. Έτσι, τυπικά η περιεκτικότητα του ορού σε λιπαρά είναι συνήθως μικρότερη του 0,1% κ.β. Ακόμη, παρόλο που ο πλήρης σε λιπαρά ορός γιαουρτιού μπορεί να είναι πιο επιθυμητός για χρήση σε προϊόντα, όπως τα διάφορα ροφήματα, λόγω της ευχάριστης γεύσης του, είναι περισσότερο επιρρεπής στο φαινόμενο του ταγγισμού, συγκριτικά με τον ορό χωρίς λιπαρά (Liaw et al. 2011). Έτσι, κρίνεται αναγκαία η απομάκρυνση των λιπαρών από τον ορό γιαουρτιού πριν την αξιοποίησή του, κυρίως για οργανοληπτικούς λόγους (Baccouche et al. 2013). Επιπρόσθετα, η αξιοποίηση του ορού με λιπαρά δεν ενδείκνυται, ακόμη και στις περιπτώσεις που ο ορός παστεριώνεται, καθώς ο χρόνος αποθήκευσής του μπορεί να οδηγήσει σε οξείδωση των ενώσεων των λιπιδίων, αυξάνοντας τις αρωματικές ουσίες που παράγονται σε αυτόν (Román et al. 2009).

1.2.5 Βιταμίνες

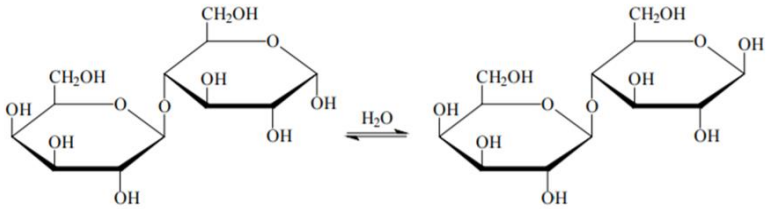
Κατά τη διαδικασία παραλαβής του ορού από το γιαούρτι, οι υδατοδιαλυτές βιταμίνες μεταφέρονται από το γιαούρτι στον ορό. Συγκεκριμένα, οι βιταμίνες που μεταφέρονται στον όξινο ορό αποτελούν το 40-70% της βιταμίνης B12, 55-75% της βιταμίνης B6 και του

παντοθενικού οξέος (B5), 70-80% της ριβοφλαβίνης (B2) και βιοτίνης (B7), και 80-90% των θειαμίνης (B1), νικοτινικού, φολικού και ασκορβικού οξέος του γάλακτος από το οποίο παράγεται. Παρατηρείται ότι ο ορός περιέχει μεγάλο ποσοστό των συνολικών βιταμινών του γιαουρτιού, επιβεβαιώνοντας τη δυνατότητα αξιοποίηση του όξινου ορού λόγω της θρεπτικότητάς του (Zadow 1992).

1.3 Η λακτόζη ως πρώτη ύλη για την παραγωγή άλλων προϊόντων

1.3.1 Εισαγωγή

Η λακτόζη είναι ένας δισακχαρίτης που αποτελείται από ένα μόριο γαλακτόζης και ένα μόριο γλυκόζης, τα οποία συνδέονται μεταξύ τους με β-(1→4) γλυκοζιτικό δεσμό. Ακόμη, στην ανθρακική αλυσίδα της λακτόζης, ο C-1 άνθρακας στο τμήμα της γλυκόζης είναι ανωμερές, δεδομένου ότι φέρει μια ομάδα υδροξυλίου η οποία είναι ελεύθερη να βρεθεί είτε πάνω είτε κάτω από το επίπεδο του δακτυλίου. Αυτή η ομάδα υδροξυλίου είναι υπεύθυνη για την ύπαρξη δύο ισομερών μορφών λακτόζης, της α- και β-λακτόζης (McSweeney & Fox 2009, Kellam 1998).



***Εικόνα 1.1**. Η δομή της α- και β- λακτόζης*

Η α- και β-λακτόζη έχουν πολύ διαφορετικές ιδιότητες μεταξύ τους. Η α-λακτόζη εμφανίζεται συχνότερα και βρίσκεται σε κρυσταλλική ένυδρη μονοϋδρική μορφή, ενώ η β-λακτόζη είναι άνυδρη και λιγότερο συχνή, ενώ κρυσταλλώνεται σε θερμοκρασίες μεγαλύτερες των 93,5°C. Ακόμη εμφανίζουν έντονες διαφορές ως προς τον πολυμορφισμό τους, με έντονη διαφορά στην ειδική στροφική ικανότητα, ενώ έχουν διαλυτότητα 70 και 500 g/L, σε θερμοκρασία 20°C, για την α- και β-λακτόζη, αντίστοιχα (McSweeney & Fox 2009).

Παρά το γεγονός ότι η α-λακτόζη και η β-λακτόζη διαφέρουν μόνο ως προς το ανωμερές της γλυκόζης και όχι ως προς τον δεσμό των μονομερών, οι διαφορετικές μορφές της λακτόζης παρουσιάζουν και διαφορετικές φυσικές ιδιότητες, κάποιες από τις οποίες περιγράφονται στον Πίνακα 1.2.

***Πίνακας 1.2.** Φυσικές ιδιότητες α- και β- λακτόζης*

Ιδιότητες	α-λακτόζη	β-λακτόζη
Μοριακό βάρος (Da)	360,3	342,3
Σημείο τήξης (°C)	202	252
Πυκνότητα ($g \cdot mL^{-1}$)	1,545	1,59
Ειδική στροφική ικανότητα (a20589)	+91,1	+33,5
Θερμότητα διαλυτοποίησης ($J \cdot g^{-1}$)	-50,24	-9,62
Διαλυτότητα σε νερό στους 20°C (g/100 mL)	7,4	50,0

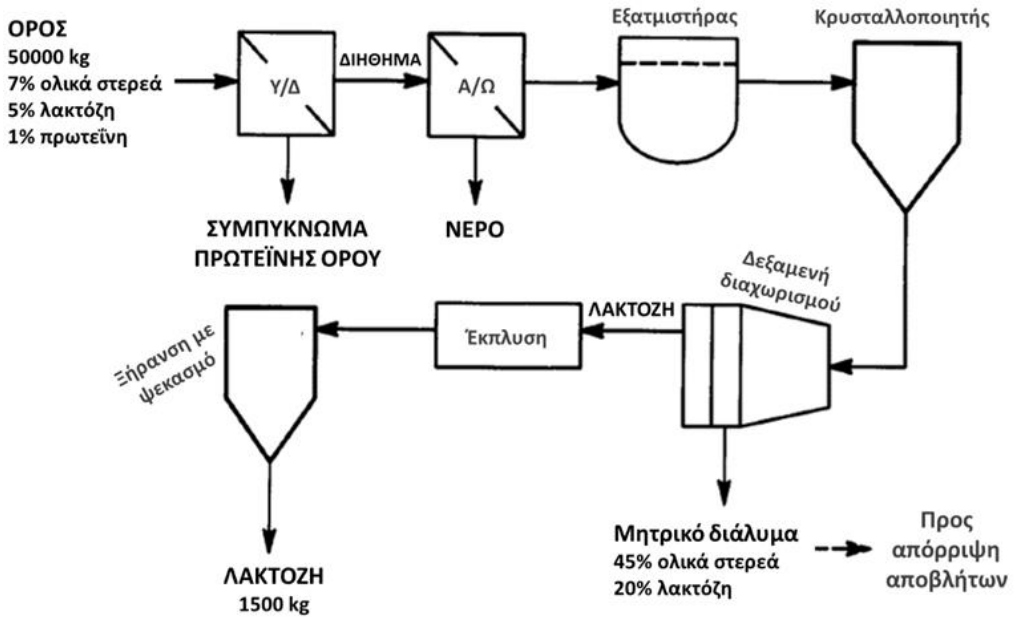
1.3.2 Η λακτόζη του ορού

Ο ορός γιαουρτιού είναι ένα απόβλητο της γαλακτοβιομηχανίας που παράγεται σε τεράστιες ποσότητες ημερησίως, αλλά η βιοτεχνολογική αξιοποίηση του δεν ενδείκνυται οικονομικά, καθώς οι χρήσεις του περιορίζονται έντονα από την υψηλή περιεκτικότητα λακτόζης, περίπου ίση με 5% κ.ό.

Οι μέθοδοι παραγωγής λακτόζης από ορό είναι τρεις, με πιο κοινή εκείνη της κρυστάλλωσης της λακτόζης, η οποία είναι οικονομικά εφικτή μόνο για μεγάλης κλίμακας παραγωγή (Harper 1992). Ακόμη, η καταβύθιση της λακτόζης με μεταλλικές αλκαλικές γαίες που σχηματίζουν σύμπλοκα με σάκχαρα, γνωστή ως μέθοδος Steffan, αποτελεί μια δεύτερη μέθοδο παραγωγής λακτόζης, ενώ η χρήση αλκοολών ή άλλων διαλυτών που μειώνουν την διαλυτότητα της λακτόζης, δεδομένου ότι μπορούν επίσης να αξιοποιηθούν στην κρυστάλλωση της λακτόζης, αποτελεί την τελευταία αλλά μη χρησιμοποιήσιμη μέχρι στιγμής μέθοδος.

Στην Εικόνα 1.2 παρουσιάζεται ένα διάγραμμα ροής διαχείρισης του ορού σε βιομηχανική κλίμακα με τη μέθοδο της κρυστάλλωσης. Αρχικά απομακρύνονται οι πρωτεΐνες ορού με υπερδιήθηση. Σε μερικές διεργασίες, αντίστροφη ώσμωση λαμβάνει μέρος για την αύξηση της περιεκτικότητας του ορού σε στερεά σε ποσοστό 12-15% (Yang & Silva 1995).

Η ανάκτηση όλου του ποσοστού της λακτόζης που περιέχεται στον ορό μέσω της κρυστάλλωσης δεν είναι οικονομικά βιώσιμη, καθώς λόγω της υψηλής περιεκτικότητας του ορού σε λακτόζη ένα ποσοστό της τάξης 20-40% του αρχικού ποσοστού της λακτόζης παραμένει στο αρχικό διάλυμα και δεν αξιοποιείται βιομηχανικά.



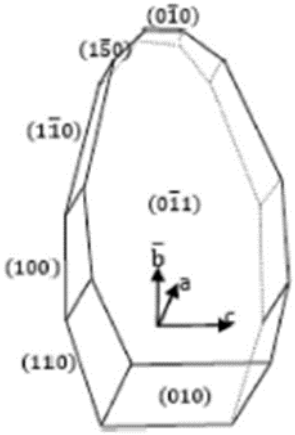
Εικόνα 1.2. *Διάγραμμα διαχείρισης ορού σε βιομηχανική κλίμακα με τη μέθοδο της κρυστάλλωσης (όπου Υ/Δ: υπερδιήθηση, Α/Ω: αντίστροφη ώσμωση)*

1.3.3 Κρυστάλλωση της λακτόζης

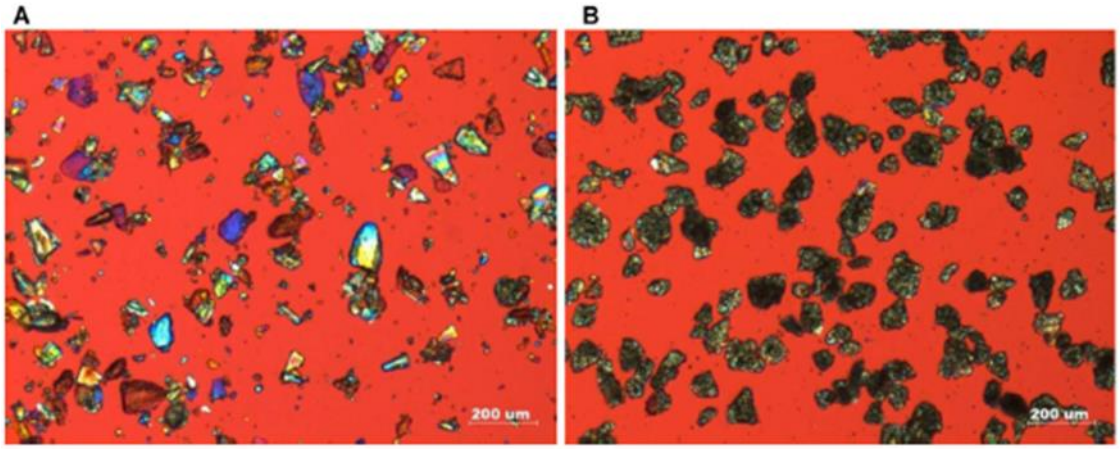
Η λακτόζη μπορεί να εμφανιστεί σε διαφορετικά κρυσταλλικά πολύμορφα, ανάλογα με τις συνθήκες κρυστάλλωσής της, ενώ κάθε διαφορετικό πολύμορφο έχει τις δικές του ειδικές

ιδιότητες. Η α-λακτόζη, η οποία κρυσταλλώνεται ως ένυδρο άλας που περιέχει ισομοριακές ποσότητες λακτόζης και νερού, έχει πολύ σκληρούς κρυστάλλους που δεν εμφανίζουν υγροσκοπικότητα, ενώ η ένυδρη β-λακτόζη, κρυσταλλώνεται σε θερμοκρασίες μεγαλύτερες των 93,5°C, σχηματίζοντας μικρότερους κρυστάλλους, με διαλυτότητα έως και 10 φορές υψηλότερη από εκείνη της α-λακτόζης (Johnson & Conforti 2003).

Ένα σχηματικό διάγραμμα ενός τυπικού κρυστάλλου μονοϋδρικής α-λακτόζης φαίνεται στην Εικόνα 1.3. Οι κρύσταλλοι της α-λακτόζης είναι μονοκλινικοί, σφαιροειδείς και έχουν μόνο έναν άξονα συμμετρίας. Έχουν τραπεζοειδείς πλευρικές όψεις, ρομβικές κορυφές και λοξή όψη στη βάση και την κορυφή, δίνοντας στον κρύσταλλο μια ξεχωριστή εμφάνιση. Η μικροδομή τόσο για τους κρυστάλλους της α- όσο και της β-λακτόζης φαίνονται στην Εικόνα 1.4, διακρίνοντας την ευρεία ποικιλία σχημάτων και χρωμάτων, ανάλογα με τον τύπο και τις συνθήκες κρυστάλλωσης (Wong & Hartel 2014).



Εικόνα 1.3. *Κρύσταλλος Tomahawk της μονοϋδρικής α-λακτόζης*



Εικόνα 1.4. *Εικόνες της μικροδομής της α- και β- λακτόζης*

Γενικά, ο ρυθμός αύξησης των κρυστάλλων της λακτόζης ρυθμίζεται από το ρυθμό διάσπαση της λακτόζης στα δύο ανωμερή της, την α-λακτόζη με χαμηλή τη διαλυτότητα και τη β-λακτόζη με την υψηλή διαλυτότητα, προκαλώντας τελικά υπερκορεσμό α-λακτόζης (Wang et al. 2015). Η διαλυτότητα της λακτόζης είναι μια ιδιότητα που επηρεάζει τη χρήση της σε

εφαρμογές σε τρόφιμα ή και σε άλλους τομείς, με τη β-λακτόζη να κυριαρχεί σε εφαρμογές σε προϊόντα που απαιτούν τη γρήγορη διαλυτοποίηση της λακτόζης (Yang & Silva 1995).

1.3.4 Εφαρμογές της λακτόζης

Η πρώτη σημαντική εφαρμογή της λακτόζης ήταν η χρήση της ως υπόστρωμα για την ανάπτυξη του μύκητα *Penicillium chrysogenum* για την παραγωγή πενικιλίνης. Παρόλο που μετά το 1950 βρέθηκαν αλλά στελέχη του μύκητα που αναπτύσσονται σε φθηνότερα υποστρώματα, ορισμένα προϊόντα της ζύμωσης εξακολουθούν να παράγονται μόνο σε υπόστρωμα λακτόζης, καθώς επωφελούνται από την καθυστερημένη υδρόλυσή της.

Σήμερα, η λακτόζη χρησιμοποιείται ευρέως στις βιομηχανίες τροφίμων λόγω της χαμηλής της γλυκύτητας (περίπου ίση με το 30% της γλυκύτητας της σακχαρόζης), ενώ παράλληλα δεσμεύει τις γεύσεις και τα αρώματα των τροφίμων, αυξάνοντας τη διάρκεια αποθήκευσής τους. Ακόμη, η λακτόζη χρησιμοποιείται στην παρασκευή ψημένων προϊόντων, καθώς μπορεί να επηρεαστεί από την αντίδραση Maillard προσδίδοντας στο εκάστοτε τρόφιμο το επιθυμητό καφέ χρώμα (Boutin 2005). Άλλη μία εφαρμογή της λακτόζης είναι η προσθήκη της στο αγελαδινό γάλα για την παρασκευή βρεφικών και παιδικών γαλακτοκομικών προϊόντων, λόγω της μεγάλης θρεπτικότητάς της (McSweeney & Fox 2009).

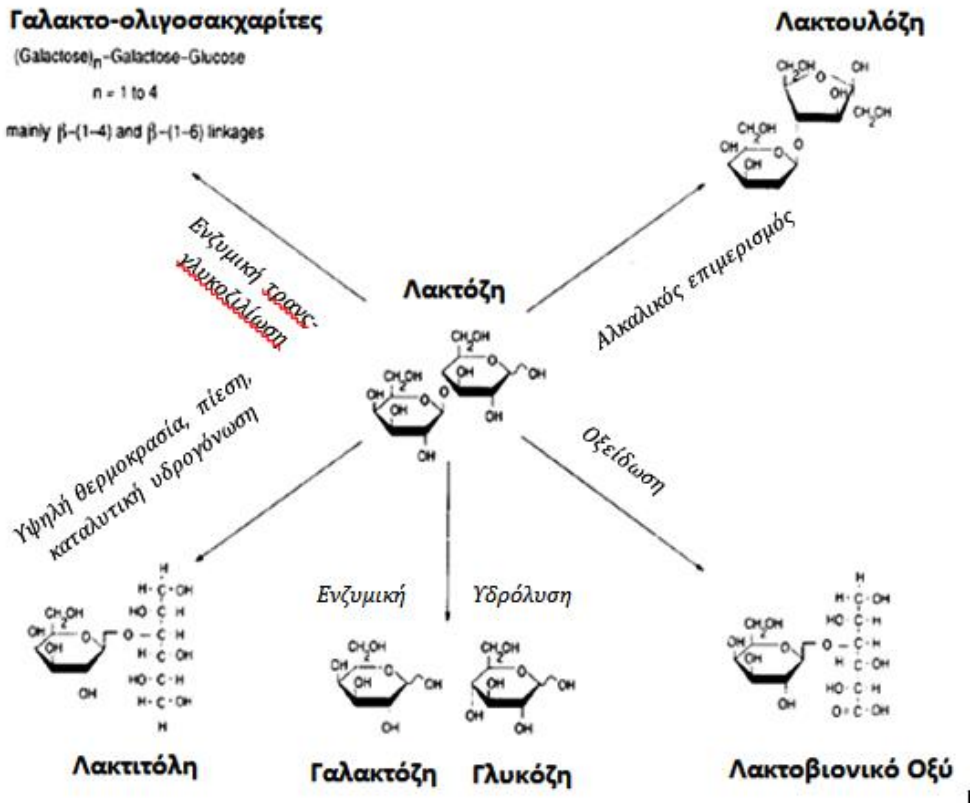
Από την άλλη, η λακτόζη με τη μορφή της α-λακτόζης, χρησιμοποιείται από τη φαρμακευτική βιομηχανία ως μια αδρανής ουσία που προστατεύει και ενισχύει τη βιολογική διαθεσιμότητα και ασφάλεια του φαρμάκου, με χρήση ως συνδετικό συστατικό μέσα σε δισκία, κάψουλες και άλλες μορφές φαρμάκων που προορίζονται για λήψη από του στόματος.

Η α-λακτόζη χρησιμοποιείται επίσης για την παραγωγή και άλλων ενώσεων (Εικόνα 1.5, Yang & Silva 1995), όπως τη λακτιτόλη, που χρησιμοποιείται σε διαβητικά προϊόντα, γλυκαντικά χαμηλής θερμιδικής αξίας και προϊόντα αδυνατίσματος, το γαλακτικό οξύ και τη λακτουλόζη. Καθένα από τα ανωτέρω προϊόντα της λακτόζης, έχει ευρεία εφαρμογή στη βιομηχανία τροφίμων. Η β-λακτόζη βρίσκει επίσης εφαρμογές τόσο στη φαρμακευτική όσο και στη βιομηχανία τροφίμων (Kellam 1998).

1.3.5 Μειονεκτήματα – Δυσανεξία στη λακτόζη

Η λακτόζη εμφανίζει κάποια μειονεκτήματα όταν χρησιμοποιείται στα τρόφιμα, όπως η χαμηλή διαλυτότητά της και η τάση προς κρυστάλλωση σε σχετικά μικρές συγκεντρώσεις, η οποία οδηγεί σε μη επιθυμητά οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του τελικού προϊόντος που σχετίζονται με την υφή (Szczodrak 2000).

Επιπρόσθετα, λόγω της υδρόλυση της λακτόζης στα μονομερή της από τις λακτάσες πριν το λεπτό έντερο, παρουσιάζει προβλήματα που σχετίζονται με την ευπεπτότητά της. Άτομα με έλλειψη στο ένζυμο της β-γαλακτοζιδάσης αντιμετωπίζουν προβλήματα δυσανεξίας στη λακτόζη. Η δυσανεξία στη λακτόζη χαρακτηρίζει άτομα που δεν μπορούν να πέψουν 10-50 g καθαρής λακτόζης και εμφανίζουν συμπτώματα όπως διάρροια, πρήξιμο κ.ά., μετά από κατανάλωση ακόμα και σχετικά μικρών ποσοτήτων λακτόζης. Η συχνότητα εμφάνισης της ασθένειας αυτής είναι ύψιστης σημασίας για τις βιομηχανίες τροφίμων και φαρμάκων, καθώς θα πρέπει να λαμβάνεται υπόψη κατά την κατανάλωση τροφίμων ή φαρμακευτικών προϊόντων που περιέχουν λακτόζη στα συστατικά τους (Zadow 1992).



Εικόνα 1.5. *Η λακτόζη και τα παράγωγά της (Yang & Silva 1995)*

1.4 Αξιοποίηση του ορού γιαουρτιού

Το κύριο κλάσμα των ολικών στερεών του ορού γάλακτος, όπως ήδη αναφέρθηκε, είναι η λακτόζη μαζί με διαλυτές πρωτεΐνες, βιταμίνες, άλατα και λίπη. Η ύπαρξή τους οδηγεί στη χρήση του ορού γιαουρτιού ως υπόστρωμα σε διάφορες βιοτεχνολογικές και φυσικοχημικές διεργασίες για βιομηχανική παραγωγή πολύτιμων προϊόντων (Prazeres et al. 2012).

Ο γλυκός ορός χαρακτηρίζεται από την υψηλή περιεκτικότητα σε πρωτεΐνες. Για το λόγο αυτό καταλαμβάνει κύρια θέση στην παραγωγή βρεφικών παρασκευασμάτων και ροφημάτων ορού γάλακτος, που αποτελούν πηγή πρωτεΐνης υψηλής ποιότητας (Chung et al. 2012). Μια άλλη μέθοδος αξιοποίησης του γλυκού ορού, είναι η παραγωγή αλκοολούχων ποτών, όπως η μπύρα ορού γάλακτος, το κρασί και το αφρώδες κρασί τύπου σαμπάνια. Τα ποτά αυτά χαρακτηρίζονται από χαμηλή περιεκτικότητα σε αλκοόλ (≤1,5%), ενώ παρασκευάζονται κυρίως από γλυκό ορό γάλακτος με την προσθήκη στελεχών του ζυμομύκητα *Kluyveromyces fragilis* ή *Kluyveromyces lactis* (Jeličić et al. 2008, Wendorff 2008). Μάλιστα, σύμφωνα με τον Wendorff (2008), ο ορός γιαουρτιού είναι η ιδανική πρώτη ύλη για την παραγωγή μπύρας, λόγω της υψηλής περιεκτικότητας σε ανόργανα άλατα και λακτόζη, η οποία ως αποτέλεσμα της αντίδρασης Maillard, επηρεάζει το χρώμα του τελικού προϊόντος. Σύμφωνα όμως με τους Jeličić et al. (2008), η ύπαρξη λιπαρών στον ορό μπορεί να είναι προβληματική, καθώς τα λιπαρά έχουν καταστρεπτική επίδραση στον αφρό της μπύρας, αλλοιώνοντας το τελικό προϊόν.

Από την άλλη, οι χρήσεις του όξινου ορού γιαουρτιού μέχρι στιγμής είναι περιορισμένες. Μέρος της παραγωγής όξινου ορού, δεδομένου των πλούσιων θρεπτικών συστατικών που περιέχει, χρησιμοποιείται ως φυσικό λίπασμα στη γεωργία. Παρόλα αυτά, η υπερβολικά μεγάλη ποσότητα του ορού γάλακτος στη γη, οδηγεί στη μεταφορά του ορού σε κοντινούς υδάτινους ορίζοντες, προκαλώντας ευτροφισμό, χαμηλά επίπεδα διαλυμένου οξυγόνου στο έδαφος και κατ' επέκταση μείωση της υδάτινης πανίδας, αν το ρεύμα αυτό φθάσει σε θαλάσσιο περιβάλλον. Επιπλέον, ο όξινος ορός γάλακτος ως λίπασμα, προκαλεί έντονη δυσοσμία όταν εκτεθεί στον ήλιο, οδηγώντας σε μη επιθυμητές συνθήκες τόσο για τους γεωργούς, όσο και για τους ανθρώπους που μένουν στις γύρω περιοχές (Erickson 2017).

Γενικά, το πιο αξιοσημείωτο χαρακτηριστικό του όξινου ορού γιαουρτιού είναι η υψηλή του περιεκτικότητα σε λακτόζη. Κατά συνέπεια, μια από τις πιθανές αξιοποιήσεις του θα ήταν η χρήση της λακτόζης ως αρχικό συστατικό για την παραγωγή άλλων συστατικών ύστερα από ζύμωση. Η αξιοποίησή του έχει ως κύριο στόχο τη μείωση των αποβλήτων και επομένως τη μείωση των περιβαλλοντικών επιπτώσεων από την απόρριψή του. Κάτι τέτοιο θα συνέβαλε σημαντικά στην αειφόρο ανάπτυξη των βιομηχανιών τροφίμων και κυρίως των βιομηχανιών γιαουρτιού, οι οποίες τώρα αντιμετωπίζουν ένα σημαντικό πρόβλημα με τον ορό που παράγουν και τη διαχείρισή του. Ωστόσο, η βιομηχανική αξιοποίηση του όξινου ορού γάλακτος από υπολείμματα γιαουρτιού βρίσκεται σε πολύ πρώιμο στάδιο και χρειάζεται ακόμα έρευνα προς αυτή την κατεύθυνση (Alonso et al. 2010).

Κεφάλαιο 2ο
Βιοτεχνολογική αξιοποίηση της λακτόζης

2.1 Εισαγωγή

Η β-γαλακτοζιδάση, η οποία αναφέρεται και ως λακτάση, είναι ένα εμπορικό ένζυμο που χρησιμοποιείται στη βιομηχανία τροφίμων για την παραγωγή γάλακτος και γαλακτοκομικών προϊόντων χαμηλής περιεκτικότητας σε λακτόζη (Guerrero et al. 2015). Αν και είναι υδρολάση, παράλληλα δρα και ως καταλύτης στην αντίδραση της τρανσγαλακτοζυλίωσης και τη σύνθεση των γαλακτοολιγοσακχαριτών (galacto-oligosaccharides, GOS (Albayrak & Yang 2002, Kim et al. 2006, Vera et al. 2012).

Εικόνα 2.1. Το ένζυμο της β-γαλακτοζιδάσης

Η υδρολυτική δράση της β-γαλακτοζιδάσης αξιοποιείται από τη βιομηχανία των τροφίμων με στόχο τη μείωση της περιεχόμενης λακτόζης στα προϊόντα που απαιτείται, την πρόληψη των προβλημάτων κρυστάλλωσης της λακτόζης αλλά και την αύξηση της γλυκύτητας, της γεύσης και της διαλυτότητάς της στο τελικό προϊόν (Gänzle et al. 2008). Επιπλέον, η υδρόλυση της λακτόζης σε γλυκόζη και γαλακτόζη επιτρέπει την παραγωγή προϊόντων χωρίς λακτόζη, που είναι κατάλληλα για ανθρώπους με δυσανεξία στη λακτόζη, από την οποία πάσχει περίπου το 65% του συνολικού πληθυσμού, φτάνοντας ακόμη και στο ποσοστό μεγαλύτερο από 90% σε κάποιες περιοχές, όπως της ανατολικής Ασίας. Η δυσανεξία στη λακτόζη, οφείλεται στην έλλειψη του ενζύμου της β-γαλακτοζιδάσης, έχοντας ως αποτέλεσμα τη μη απορρόφηση της λακτόζης από το πεπτικό σύστημα, η οποία μπορεί να προκαλέσει ποικίλα συμπτώματα όπως κοιλιακές κράμπες, φούσκωμα, διάρροια ή φλεγμονή (Bhatnagar & Aggarwal 2007).

2.2 Παραγωγή β-γαλακτοζιδάσης

Το ένζυμο της β-γαλακτοζιδάσης βρίσκεται σε βακτήρια, μύκητες και ζυμομύκητες. Χαρακτηριστική βέβαια είναι και η παρουσία του σε καρποφόρα φυτά, κυρίως αμυγδαλιές,

ροδακινιές, μηλιές και βερικοκιές. Ωστόσο, σε εμπορική και βιομηχανική κλίμακα, οι πιο συχνά χρησιμοποιούμενες πηγές για παραγωγή β-γαλακτοζιδάσης είναι από τους μικροοργανισμούς *Aspergillus oryzae* και *Kluyveromyces lactis*, κάτι που θα αναλυθεί σε επόμενο κεφάλαιο (Zhou & Chen 2001).

2.2.1 Παραγωγή β-γαλακτοζιδάσης από βακτήρια

Η β-γαλακτοζιδάση που εξάγεται από βακτηριακές πηγές χρησιμοποιείται για την υδρόλυση της λακτόζης λόγω του πλεονεκτήματος της υψηλής δραστικότητας, της ευκολίας στη ζύμωση και της σταθερότητας του ενζύμου. Συγκεκριμένα, η β-γαλακτοζιδάση που λαμβάνεται από μικροοργανισμούς του γένους των *Bifidobacteria* χρησιμοποιείται κυρίως σε τρόφιμα και συστήματα τροφίμων. Η β-γαλακτοζιδάση που παράγεται από τα βακτηριακά στελέχη των *Bifidobacterium infantis* CCRC 14633, *Bifidobacterium longum* CCRC 15708 και *Bifidobacterium longum* CCRC15708 έχουν εμφανίσει τη μεγαλύτερη ενζυμική ενεργότητα (Hsu et al. 2007). Ακόμη, πιθανές πηγές β-γαλακτοζιδάσης αποτελούν και τα βακτηριακά στελέχη των γενών *Lactobacilli* και *Bifidobacteria* (Jain et al. 2007).

2.2.2 Παραγωγή β-γαλακτοζιδάσης από ζυμομύκητες & ευρωτομύκητες

Η απομόνωση της β-γαλακτοζιδάσης από ζυμομύκητες παρουσιάζει ενδιαφέρον λόγω της χρήσης της στην παραγωγή των γαλακτοκομικών προϊόντων, ενώ το βέλτιστο pH δράσης τους κυμαίνεται από 6,0 έως 7,0 (Pivarnik et al. 1995). Ο ζυμομύκητας *Kluyveromyces lactis* είναι από τις πιο σημαντικές εμπορικά πηγές παραγωγής της β-γαλακτοζιδάσης.

Από τους ζυμομύκητες που χρησιμοποιούνται στην παραγωγή β-γαλακτοζιδάσης, αξίζει να αναφερθεί ο *Kluyveromyces marxianus*, ο οποίος παράγει ομόλογα ένζυμα β-γαλακτοζιδάσης και άλλες ετερόλογες πρωτεΐνες που αναπτύσσονται σε μια σειρά υποστρωμάτων που έχουν τη λακτόζη ως μοναδική πηγή ενέργειας. Επιπλέον, η β-γαλακτοσιδάση που απομονώνεται από το ψυχρόφιλο στέλεχος της ζύμης *Guehomyce spullulans* χρησιμοποιείται στις βιομηχανίες τροφίμων για την υδρόλυση της λακτόζης που περιέχεται στο γάλα και τον ορό γάλακτος.

Οι ενζυμικές ενεργότητες των διαφορετικής προέλευσης β-γαλακτοζιδασών επηρεάζονται από την παρουσία διαφόρων ιόντων. Η β-γαλακτοζιδάση που παράγεται από τους ζυμομύκητες των *Kluyveromyces lactis* και *Kluyveromyces fragilis* απαιτούν ιόντα όπως το μαγγάνιο (Mn^{2+}), το νάτριο (Na^{+}) και το μαγνήσιο (Mg^{2+}), ενώ η παρουσία βαρέων μετάλλων και ασβεστίου (Ca^{2+}) αναστέλλει την ενζυμική της ενεργότητα (Saqib et al. 2017).

Η β-γαλακτοζιδάση που προέρχεται από ευρωτομύκητες διαθέτει βέλτιστη περιοχή pH από 2,5 έως 5,4, καθιστώντας την ως την πιο αποτελεσματική για την υδρόλυση της λακτόζης που περιέχεται στον όξινο ορό γιαουρτιού. Γενικά, οι ευρωτομύκητες παράγουν εξαιρετικά σταθερά ένζυμα, με συνηθέστερες πηγές ευρωτομυκήτων για την παραγωγή β-γαλακτοζιδασών ορισμένα είδη του γένους *Aspergillus*, όπως ο *Aspergillus oryzae* που παράγει εξωκυτταρική β-γαλακτοζιδάση (Saqib et al. 2017). Η β-γαλακτοζιδάση που παράγεται από τον *Aspergillus oryzae* χαρακτηρίστηκε με βέλτιστη τιμή pH 5 και βέλτιστη

θερμοκρασία δράσης τους 50°C, ενώ ξεχωρίζει για την πιθανή εφαρμογή της στην αξιοποίηση του όξινου ορού γιαουρτιού, λόγω των ιδιοτήτων του κατά την υδρόλυση της λακτόζης. Η β-γαλακτοζιδάση που προέρχεται από τον *Aspergillus niger* συνήθως εμπλέκεται στην απομάκρυνση των υπολειμμάτων γαλακτόζης από ολιγοσακχαρίτες και πολυσακχαρίτες προερχόμενους από τα φυτά, και όχι από την υδρόλυση της λακτόζης (Kazemi et al. 2016).

2.2.3 Παραγωγή β-γαλακτοζιδάσης από φυτά

Η β-γαλακτοζιδάση μπορεί επίσης να προέλθει από φυτά, ενώ είναι επιβεβαιωμένο ότι το ένζυμο εμπλέκεται στην ωρίμανση πολλών καρπών, όπως του λωτού, μειώνοντας τις γαλακτοζυλομάδες του κυτταρικού τοιχώματος. Οι β-γαλακτοζιδάσες από τον καρπό της παπάγιας προκαλούν υδρόλυση του κυτταρικού τοιχώματος και κατά συνέπεια γρηγορότερη ωρίμανση του καρπού. Επίσης, έντονη είναι η δραστικότητα της β-γαλακτοζιδάσης στο κυτταρικό τοίχωμα της φράουλας, μαλακώνοντας τον καρπό, λόγω της απελευθέρωσης των ελεύθερων σακχάρων κατά τη διάρκεια της διαδικασίας ωρίμανσης του φρούτου. Επιπλέον, οι Smith και Gross (2000) αναγνώρισαν μια οικογένεια επτά β-γαλακτοζιδασών από τον καρπό της τομάτας, κατά τη διάρκεια της ωρίμανσής της, ενώ έχουν βρεθεί επίσης ίχνη β-γαλακτοζιδάσης στον καρπό του μήλου, του πεπονιού, του αβοκάντο, του ακτινίδιου, του μάνγκο και των ιαπωνικών αχλαδιών (Seddigh & Darabi 2014).

2.3 Αντίδραση υδρόλυσης

Η β-γαλακτοζιδάση χρησιμοποιήθηκε για πρώτη φορά στη γαλακτοβιομηχανία το 1950 (Dam et al. 1950), παρόλο που το γάλα και τα γαλακτοκομικά προϊόντα που παράχθηκαν με υδρόλυση της λακτόζης άρχισαν την εμφάνισή τους στην παγκόσμια αγορά τη δεκαετία του 1970, όταν έγιναν εμπορικά διαθέσιμες και οι πρώτες β-γαλακτοζιδάσες. Σήμερα η β-γαλακτοζιδάση είναι ένα από τα πιο σημαντικά ένζυμα που χρησιμοποιείται στην επεξεργασία των τροφίμων (Panesar et al. 2006).

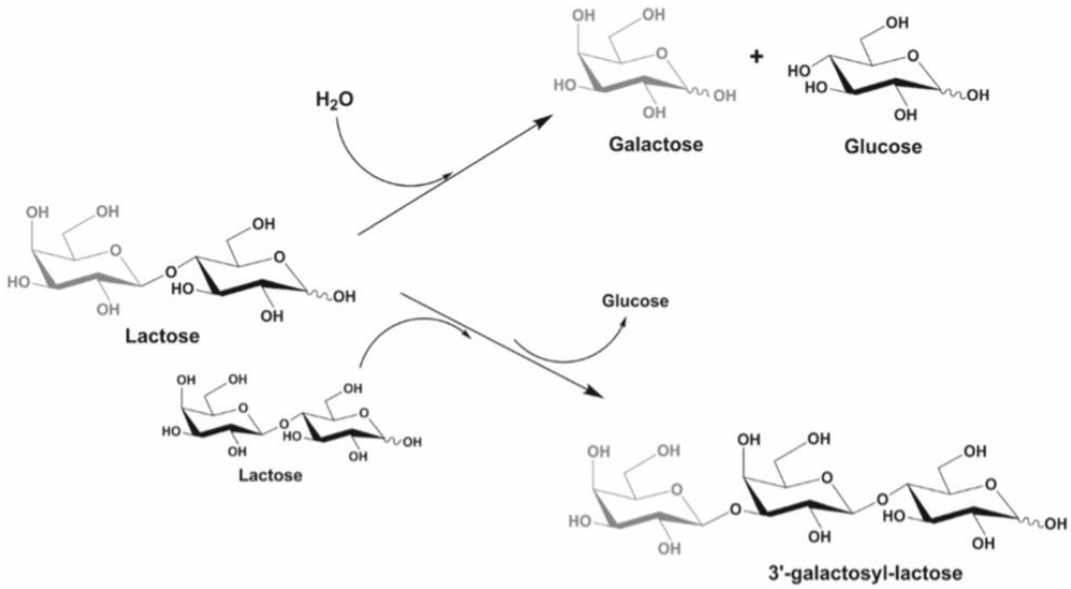
Η διαδικασία της υδρόλυσης της λακτόζης είναι απλή, ενώ δεν απαιτείται κάποιος ειδικός εξοπλισμός (Zadow 1992). Όταν χρησιμοποιείται ένα ένζυμο μίας χρήσης για την υδρόλυση της λακτόζης, θα πρέπει να ληφθούν υπόψη όλοι οι πιθανοί παράγοντες που την επηρεάζουν, όπως η συγκέντρωση του υποστρώματος, το pH του μέσου της αντίδρασης, η θερμοκρασία, ο χρόνος αντίδρασης, η ενζυμική ενεργότητα και το κόστος του ενζύμου που χρησιμοποιείται (Haider & Husain 2009).

Γενικά, η β-γαλακτοζιδάση είναι ένα υδρολυτικό ένζυμο, καθώς υδρολύει τη λακτόζη σε γλυκόζη και γαλακτόζη, ενώ έχει δύο διαφορετικούς τρόπους εφαρμογής. Μπορεί να εφαρμοστεί είτε σε διαλυτή μορφή, για διεργασίες διαλείποντος έργου, είτε σε ακινητοποιημένη μορφή, για παραγωγή προϊόντων με διεργασίες συνεχούς έργου (Bodalo et al. 2001). Παρά το υψηλό κόστος στην προσκόλληση ενζύμων, τα συστήματα ακινητοποιημένης γαλακτοζιδάσης είναι πιο οικονομικά από εκείνα των ελεύθερων ενζύμων, καθώς αυτές οι διαδικασίες είναι συνεχείς, και επιτρέπουν την επαναχρησιμοποίηση του ενζύμου (Szczodrak 2000).

2.4 Αντίδραση τρανσγαλακτοζυλίωσης

Μια βασική εφαρμογή της β-γαλακτοζιδάσης είναι η αντίδραση της τρανσγαλακτοζυλίωσης, κατά την οποία το υπόστρωμα λακτόζης ή μονοσακχαριτών (γλυκόζη και γαλακτόζη) χρησιμεύει ως δέκτης γαλακτοζυλομάδας, σχηματίζοντας μια σειρά δισακχαριτών, τρισακχαριτών αλλά και υψηλότερου βαθμού πολυμερισμού ολιγοσακχαριτών που ονομάζονται γαλακτοολιγοσακχαρίτες (Galacto-oligosaccharides, GOS) (Park & Oh 2010, Torres et al. 2010).

Παρουσία λακτόζης, η β-γαλακτοζιδάση καταλύει τόσο την υδρόλυσή της όσο και τον ολιγομερισμό της για τη σύνθεση GOS, όπως φαίνεται στην Εικόνα 2.2. Έτσι, η μέγιστη απόδοση σε GOS εξαρτάται από τη συγκέντρωση της λακτόζης και τις εγγενείς ιδιότητες του ενζύμου, δηλαδή την ικανότητά του να διώχνει τα μόρια H_2O από τη θέση πρόσδεσης του δέκτη, επιτρέποντας τη σύνδεση ενός πυρηνόφιλου σακχάρου (στο οποίο μεταφέρεται το τμήμα του γαλακτοζυλομάδας). Έτσι, η μέγιστη απόδοση σε GOS για οποιοδήποτε ένζυμο εξαρτάται από τις σχετικές ταχύτητες των αντιδράσεων της τρανσγαλακτοζυλίωσης και της υδρόλυσης (Plou et al. 2007).



Εικόνα 2.2. *Η αντίδραση υδρόλυσης και τρανσγαλακτοζυλίωσης της β-γαλακτοζιδάσης*

Κατά τη διάρκεια της αντίδρασης της τρανσγαλακτοζυλίωσης, καθώς η λακτόζη καταναλώνεται, η συγκέντρωση των GOS αυξάνεται έως ότου φτάσει σε ένα μέγιστο. Στο σημείο αυτό, ο ρυθμός σύνθεσης των GOS ισούται με τον ρυθμό υδρόλυσης αυτών. Στη συνέχεια, η υδρόλυση του προϊόντος γίνεται η κύρια διαδικασία μέχρι την επίτευξη θερμοδυναμικής ισορροπίας. Η ύπαρξη αυτού του κινητικού μέγιστου εξηγεί το ότι η τρανσγαλακτοζυλίωση έχει υψηλότερες αποδόσεις προϊόντων συμπύκνωσης σε σύγκριση με τις διεργασίες που ελέγχονται με ισορροπία. Ακόμη ισχύει ότι, υπό συνθήκες κινητικού ελέγχου, η συγκέντρωση ενζύμου δεν έχει καμία επίδραση στη μέγιστη απόδοση των GOS, εφόσον δεν συμβαίνει απενεργοποίηση του ενζύμου, ενώ επηρεάζεται μόνο ο χρόνος στον

οποίο επιτυγχάνεται η μέγιστη συγκέντρωση ολιγοσακχαριτών (Buchholz et al. 2005, Chockchaisawasdee et al. 2005).

Στον Πίνακα 2.1 συνοψίζονται οι κύριες παράμετροι της αντίδρασης και οι μέγιστες αποδόσεις σε GOS που λαμβάνονται, με δεδομένη επιλογή β-γαλακτοζιδασών. Παρατηρείται ότι, η ανώτερη περιοχή της απόδοσης σε GOS είναι κοντά στο 40-50% (Hansson & Adlercreutz 2001, Rabiu et al. 2001, Splechtna, et al. 2006), ενώ οι βέλτιστες συνθήκες δράσης του κάθε ενζύμου διαφέρουν.

Πίνακας 2.1. *Παραδείγματα β-γαλακτοζιδάσης που χρησιμοποιούνται για την παρασκευή γαλακτοολιγοσακχαριτών (Plou et al. 2017)*

Προέλευση	**Βέλτιστο pH**	**Βέλτιστη θερμοκρασία (ºC)**	**Υπόστρωμα λακτόζης (g/L)**	**Απόδοση σε GOS (%)**
Bifidobacterium bifidum	6,0	37	100	44
Escherichia coli	6,5-7,2	30-37	22-240	56
Geobacillus stearothermophilus	6,5	37	170	2,4
Lactobacillus acidophilus	6,5	30	210	39
Thermotoga maritima	6,0	80	200	19
Aspergillus aculeatus	6,5	45-60	210-240	24
Penicillium expansum	5,4	50	50	29
Aspergillus niger	7,0	40	20-300	16
Sterigmatomyces elviae	5,0	60	20	38

2.5 Η β-γαλακτοζιδάση από *Aspergillus oryzae*

Ο μύκητας *Aspergillus oryzae* παράγει β-γαλακτοζιδάση μοριακού βάρους 105 kDa και ισοηλεκτρικό σημείο στο 4,6 (Ansari & Husain 2010). Η βέλτιστη θερμοκρασία δράσης του ενζύμου είναι μεταξύ των 45-55°C (Guidini et al. 2010), ενώ οι βέλτιστες τιμές pH είναι 4,5 σε oNPG και 4,8 σε λακτόζη (Tanaka et al. 1975).

Η β-γαλακτοζιδάση από τον *A. oryzae* έχει εφαρμοσθεί με επιτυχία για τη σύνθεση GOS (Vera et al. 2012), λακτουλόζης (Guerrero et al. 2011) και γαλακτοσυλ-πολυυδροξυ-αλκοολών (galactosyl-polyhydroxy alcohols) (Irazoqui, et al. 2009). Η ακινητοποίηση του ενζύμου έχει επιτευχθεί με διάφορες μεθοδολογίες, συμπεριλαμβανομένης της ομοιοπολικής σύνδεσης με διάφορους φορείς (Gaur et al. 2006, Huerta et al 2011, Neri et al. 2011), της

ιοντικής προσρόφησης ακολουθούμενης από διασταυρούμενη σύνδεση (Guidini et al. 2010) και της παγίδευσης σε αλγινικό άλας (Freitas et al. 2011).

Κατά τη σύνθεση GOS με β-γαλακτοζιδάση από *A. oryzae* έχουν ταυτοποιηθεί διάφοροι δισακχαρίτες που περιέχουν διαφορετικούς δεσμούς, επιβεβαιώνοντας ότι η λακτόζη δεν είναι ο μόνος δισακχαρίτης, αλλά το ένζυμο συνεισφέρει στη δημιουργία και άλλων. Έτσι, έχουν ταυτοποιηθεί οι δισακχαρίτες με τους αντίστοιχους δεσμούς: Gal-(1→6)-Gal ((1→6)-γαλακτοβιόζη), Gal-(1→6)-Glc (μελιβιόζη), Gal-(1→3)-Gal και Gal-(1→3)-Glc (Plou et al. 2017). Ο χαρακτηρισμός αρκετών GOS που συντέθηκαν με χρήση β-γαλακτοζιδάσης από τον *A. oryzae* διεξήχθη για πρώτη φορά από τους Toba, Yokota, & Adachi (1985). Συγκεκριμένα, ταυτοποιήθηκαν τρεις τρισακχαρίτες [6'-γαλακτοζυλ-λακτόζη, 3'-γαλακτοζυλ-λακτόζη και Gal-β(1→4)-Gal-β(1→6)-Glc], δύο τετρασακχαρίτες [Gal-β-(1→6)-Gal-β-(1→6)-Gal-(1→4)-Glc, Gal-β-(1→6)-Gal-β-(1→3)-Gal-β-(1→4)-Glc] και ένας πεντασακχαρίτης [Gal-β-(1→6)-Gal-β-(1→6) Gal-β-(1→6)-Gal-β-(1→4)-Glc].

Από την άλλη πλευρά, οι Neri, et al. (2011) χρησιμοποίησαν ομοιοπολικά ακινητοποιημένη β-γαλακτοζιδάση από *A. oryzae* σε ένα σύνθετο σύστημα υδραζιδίου – τετραφθαλικού πολυαιθυλενίου – μαγνητίτη (hydrazide-Dacron-magnetite) και χαρακτήρισαν μερικούς από τους συντιθέμενους GOS. Με αυτό τον τρόπο εντοπίστηκαν τρεις από τους GOS που προηγουμένως είχαν χαρακτηριστεί από τους Toba, Yokota, & Adachi (1985): οι τρισακχαρίτες 6'-γαλακτοζυλ-λακτόζη και Gal-β-(1→4)-Gal-β-(1→6)-Glc, και ο τετρασακχαρίτης Gal-β-(1→6)-Gal-β-(1→6)-Gal-β-(1→4)-Glc. Ανέφεραν επίσης την ύπαρξη δισακχαρίτη που περιέχει β-(1→6) δεσμό, παρόλο που δεν δόθηκε δομική πληροφορία. Γενικά, τα ειδικά χαρακτηριστικά αυτού του ενζύμου έδειξαν τάση σχηματισμού δεσμών β-(1→6) ακολουθούμενων από β-(1→3), με μικρή συμβολή β-(1→4) δεσμών.

Ακόμη, παρατηρήθηκε ότι κατά το σχηματισμό GOS, όταν οι GOS έφθασαν μια μέγιστη συγκέντρωση, επιτυγχάνοντας μέγιστη απόδοση, στη συνέχεια η συγκέντρωση των GOS άρχισε να μειώνεται. Επίσης, αναφορικά με την επίδραση του pH και της θερμοκρασίας στη σύνθεση GOS, έχει βρεθεί ότι και οι δύο παράμετροι επηρεάζουν τον ρυθμό της ενζυμικής αντίδρασης αλλά δεν μεταβάλουν έντονα τη μέγιστη συγκέντρωση των παραγόμενων GOS (Albayrak & Yang 2002, Neri, et al. 2011). Τέλος, η αύξηση της συγκέντρωσης του υποστρώματος της λακτόζης έχει θετική επίδραση στη μέγιστη ποσότητα GOS που λαμβάνεται (Matella et al. 2006).

2.6 β-γαλακτοζιδάση από *Kluyveromyces lactis*

Ο μεσόφιλος ζυμομύκητας *Kluyveromyces lactis* είναι η κύρια εμπορική πηγή της β-γαλακτοζιδάσης (Chockchaisawasdee et al. 2005, Martinez-Villaluenga et al. 2008, Maugard et al. 2003, Pal et al. 2009). Λόγω της ενδοκυτταρικής του φύσης, η παραγωγή ελεύθερων κυττάρων β-γαλακτοζιδάσης από *K. lactis* παρεμποδίζεται από το υψηλό κόστος της διαδικασίας, λόγω της εκχύλισης ενζύμων και τη μεταγενέστερη επεξεργασία του, η οποία έρχεται σε αντίθεση με τη χαμηλή σταθερότητα του ενζύμου (Park & Oh 2010, Pinho & Passos 2011).

Από διάφορες βιοχημικές μελέτες που διεξήχθησαν, με σκοπό να βρεθούν οι βέλτιστες συνθήκες δράσης του ενζύμου, παρατηρήθηκε ότι η β-γαλακτοζιδάση που παράχθηκε από το ζυμομύκητα *K. lactis* εμφανίζει βέλτιστη τιμή pH ίση με 6,8 και βέλτιστη θερμοκρασία δράσης τους 40°C. Για το λόγο αυτό, για να χρησιμοποιηθεί η β-γαλακτοζιδάση από τον *K. lactis* στη μετατροπή της λακτόζης που περιέχεται στον όξινο ορό (pH=4,0-4,5) σε GOS, πρέπει να γίνει ρύθμιση του pH, καθώς η έλλειψη σταθερότητας του ενζύμου σε τιμή pH μικρότερη του 6,0 αποκλείει τη χρήση του στην απευθείας επεξεργασία του όξινου ορού (Pal et al. 2009, Xavier et al.2018).

Οι πιο συχνοί GOS που συντίθεται από το ένζυμο της β-γαλακτοζιδάσης από *K. lactis* αντιστοιχούν στους δισακχαρίτες 6-γαλακτοβιόζη (Gal-β(1→6)-Gal) και αλλολακτόζη (Gal-β(1→6)-Glc) και στον τρισακχαρίτη 6'-γαλακτοζυλ-λακτόζη (Gal-β(1→6)-Gal-β(1→4)-Glc). Είναι ενδιαφέρον ότι και τα τρία κύρια προϊόντα που συντίθεται από την β-γαλακτοζιδάση του *K. lactis* περιέχουν β-(1→6) γλυκοζιτικό δεσμό μεταξύ δύο μορίων γαλακτόζης ή μεταξύ ενός μορίου γαλακτόζης και ενός μορίου γλυκόζης. Αυτή η εκλεκτικότητα του προϊόντος είναι βιολογικής σημασίας, καθώς είναι αποδεκτό ότι οι δεσμοί β-(1→6) διασπώνται πολύ γρήγορα από β-γαλακτοζιδάσες από *Bifidobacteria* (Martinez-Villaluenga et al. 2008), που αποτελεί βασικό παράγοντα στις πρεβιοτικές ιδιότητες των GOS (Plou et al. 2017).

2.7 Βιομηχανική αξιοποίηση της β-γαλακτοζιδάσης

Σε βιομηχανική κλίμακα, η β-γαλακτοζιδάση, τόσο βακτηριακής όσο και μυκητιακής προέλευσης, εμφανίζει πολλές χρήσεις στην επεξεργασία των γαλακτοκομικών προϊόντων. Ακόμη, β-γαλακτοζιδάση χρησιμοποιείται και κατά την παραγωγή φαρμάκων, τα οποία απαιτείται να λαμβάνονται πριν την κατανάλωση γαλακτοκομικών προϊόντων (Francesconi et al. 2016). Σε αυτή την περίπτωση, προτιμάται η χρήση β-γαλακτοζιδάσης μυκητιακής προέλευσης, και κυρίως από το γένος *Aspergillus*, που εμφανίζουν χαμηλή τιμή βέλτιστου pH δράσης, που επιτρέπει τη διατήρηση της τιμής pH του στομαχιού (Panesar et al. 2007).

Στις βιομηχανίες τροφίμων, η χρήση του ενζύμου της β-γαλακτοζιδάσης δεν προτιμάται μόνο κατά την υδρόλυση της λακτόζης στην παραγωγή προϊόντων χωρίς λακτόζη, αλλά χρησιμοποιείται επίσης και για να μειώσει την κρυστάλλωση της λακτόζης σε παγωτά και συμπυκνωμένο γάλα, που συμβαίνει λόγω της υψηλής συγκέντρωσης αυτών των προϊόντων σε λακτόζη. Με τη χρήση β-γαλακτοζιδάσης, επιτυγχάνεται η βελτίωση της υφής των προϊόντων και τα προϊόντα αυτά καθίσταται πιο εύπεπτα, καθώς τα τελικά προϊόντα της υδρόλυσης της λακτόζης (γλυκόζη και γαλακτόζη) ζυμώνονται πιο εύκολα, μειώνοντας το συνολικό χρόνο που απαιτείται για να επιτευχθεί το προτιμώμενο pH των προϊόντων, όπως το γιαούρτι και το τυρί cottage.

Επιπλέον, με τη χρήση του ενζύμου της β-γαλακτοζιδάσης μειώνεται η ανάγκη για προσθήκη επιπλέον γλυκαντικών, μειώνοντας έτσι την ποσότητα θερμίδων στο τελικό προϊόν (Domingues et al. 2005).

Τέλος, αρκετές μελέτες έχουν δείξει ότι η β-γαλακτοζιδάση χρησιμοποιείται επίσης και στην παραγωγή άλλων προϊόντων βιομηχανικής σημασίας, όπως η αιθανόλη και οι βιοαισθητήρες. Συγκεκριμένα, οι Rodríguez et al. (2014) ανέφεραν την παραγωγή αιθανόλης και του ενζύμου

της β-γαλακτοσιδάσης εξωκυτταρικά με χρήση ανασυνδυασμένων κυττάρων από τον μικροοργανισμό *S. cerevisiae*, με παραγωγικότητα αιθανόλης 9 g/h και με ταυτόχρονη παραγωγή του ενζύμου. Η παραπάνω παρατήρηση επιβεβαιώθηκε και από την έρευνα του Grosová et al. (2009), με σκοπό να γίνει κινητική μελέτη της αλκοολικής ζύμωσης με χρήση του *S. cerevisiae*, στην οποία παρατηρήθηκε ότι αύξηση της αρχικής συγκέντρωσης της λακτόζης βελτίωσε γραμμικά την παραγωγή αιθανόλης (Saqib 2017).

Κεφάλαιο 3ο
Οι γαλακτοολιγοσακχαρίτες ως προϊόντα βιοκαταλύσεων

3.1 Εισαγωγή

Οι γαλακτοολιγοσακχαρίτες (Galactooligosaccharides, GOS) είναι συστατικά διαφόρων τροφίμων που βασίζονται στους υδατάνθρακες και ανήκουν, λόγω της ασφαλής τους φύσης, στην ομάδα των πρεβιοτικών. Λόγω των οφελών που παρέχουν στην υγεία του ατόμου, οι GOS έχουν γίνει ένας πυρήνας μελέτης στον τομέα των λειτουργικών τροφίμων.

Αν και στο παρελθόν, οι GOS ήταν αναγνωρισμένοι ως συστατικά τροφίμων ελάχιστης σημασίας λόγω, μεταξύ άλλων, της χαμηλής τους γλυκύτητας, της χαμηλής διαλυτότητας στο νερό και της χαμηλής πεπτικότητας, πλέον είναι αποδεδειγμένο ότι διεγείρουν επιλεκτικά τα ευεργετικά βακτήρια που αναπτύσσονται στο κάτω μέρος του ανθρώπινου εντέρου (Schaafsma 2008).

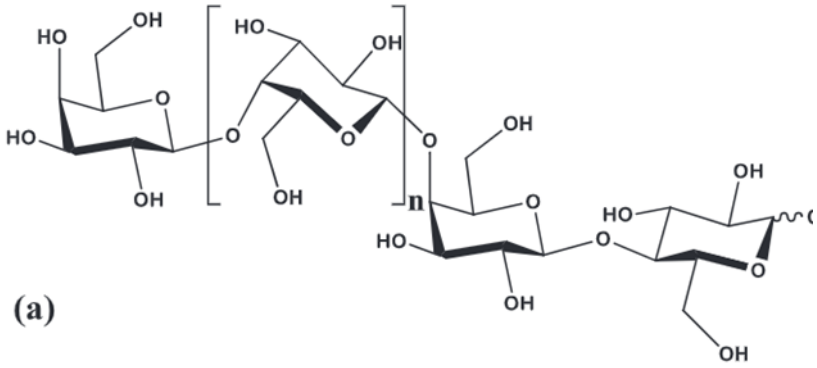
Οι GOS μπορούν να συντεθούν από δύο κύριες πηγές: τη σόγια και τη λακτόζη. Οι GOS που συντίθεται από λακτόζη, μοιάζουν με τους ολιγοσακχαρίτες που υπάρχουν φυσικά στο ανθρώπινο μητρικό γάλα και συνεπώς η κύρια χρήση τους βασίζεται στην προσθήκη τους σε βρεφικές και παιδικές τροφές. Το εμπορικό ενδιαφέρον που εμφανίζουν οι GOS σχετίζεται με το γεγονός ότι πρόκειται για ολιγοσακχαρίτες με βάση τη γαλακτόζη και ότι παρουσιάζουν δομικές ομοιότητες με τους ολιγοσακχαρίτες που απαντώνται στο ανθρώπινο γάλα (Human Milk Oligosaccharides, HMOs).

Το ανθρώπινο γάλα περιέχει περίπου 7% λακτόζη και 1% HMOs που αποτελούνται από λακτόζη συνδεδεμένη με φρουκτόζη, N-ακετυλογλυκοζαμίνη και σιαλικό οξύ. Οι HMOs είναι το τρίτο μεγαλύτερο στερεό συστατικό που περιέχεται στο ανθρώπινο γάλα, μετά τη λακτόζη και τα λιπαρά. Οι περισσότερες από τις προηγούμενες μελέτες αναφέρουν ότι οι ολιγοσακχαρίτες του ανθρώπινου γάλακτος αποτελούνται από 60%-90% GOS και 10%-40% φρουκτοολιγοσακχαρίτες (Fructooligosaccharides, FOS), κατά τους πρώτους μήνες της γαλουχίας (Xiao-ming et al. 2004, Sangwan et al. 2011).

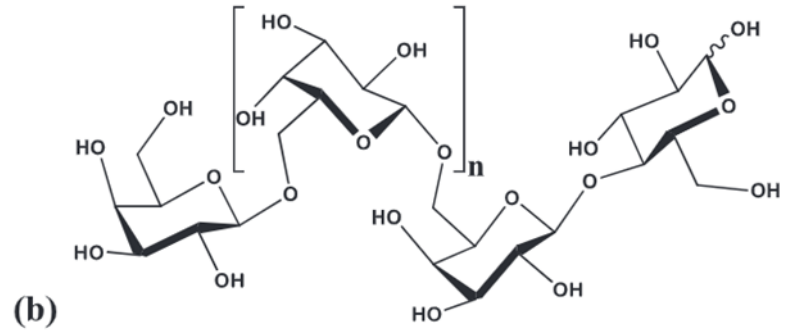
3.2 Παραγωγή γαλακτοολιγοσακχαριτών (GOS)

Η παραγωγή των γαλακτοολιγοσακχαριτών (GOS) μπορεί να πραγματοποιηθεί τόσο με χημικές μεθόδους όσο και με χρήση ενζύμων. Η χημική σύνθεση των GOS γίνεται με τη δράση ανόργανων οξέων σε μονοσακχαρίτες, που οδηγεί στο σχηματισμό πολύπλοκων μιγμάτων δισακχαριτών και τρισακχαριτών, καθώς και άλλων σακχάρων που εμφανίζουν ποικίλες α- και β- στερεοδιατάξεις. Παρόλα αυτά, λόγω της έλλειψης εξειδίκευσης στην παραγωγή του προϊόντος, αυτή η μέθοδος δεν έχει εφαρμοστεί για την παραγωγή GOS σε μεγάλη κλίμακα (Panesar 2018).

Τα προβλήματα της μεθόδου της χημικής σύνθεσης (Εικόνα 3.1) είναι ότι απαιτούνται πάρα πολλά στάδια αντίδρασης για την προστασία των ομάδων υδροξυλίου, αλλά και η επίδραση των διαφορετικών χημικών ουσιών που εκλύονται προς το περιβάλλον (Hansson & Adlercreutz 2001).



β-D-Gal*p*-(1[→ 4)-β-D-Gal*p*-(1] → 4)-β-D-Gal*p*-(1→ 4)-D-Glc



β-D-Gal*p*-(1→ [6)-β-D-Gal*p*-(1→]6)-β-D-Gal*p*-(1→ 4)-D-Glc

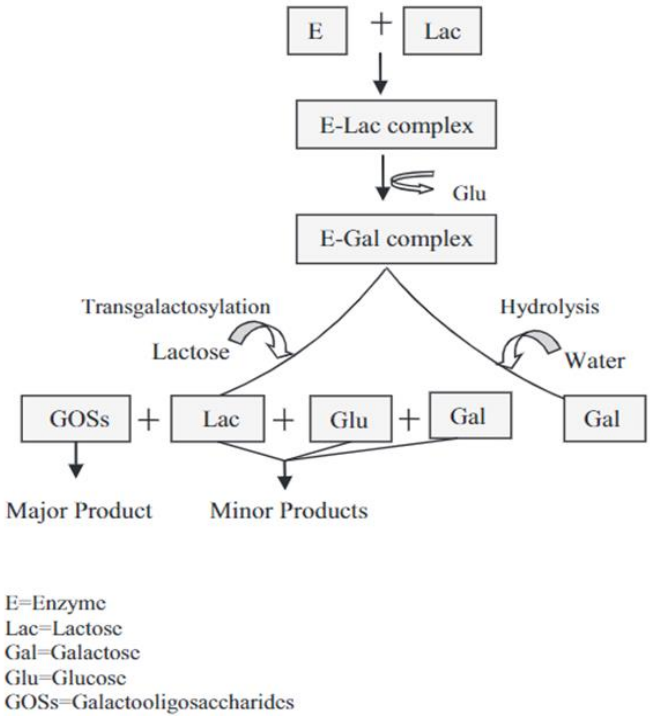
Εικόνα 3.1. *Χημική παραγωγή γαλακτοολιγοσακχαριτών: (a) β-(1–4) δεσμός και (b) β-(1–6) δεσμός*

3.2.1 Ενζυμική παραγωγή GOS και παράγοντες που την επηρεάζουν

Εναλλακτικά της χημικής μεθόδου, για τη σύνθεση των γαλακτοολιγοσακχαριτών αναπτύσσεται η μέθοδος με τη χρήση ενζύμων. Σε αντίθεση με τις χημικές διεργασίες, οι ενζυμικές διαδικασίες είναι πιο εφικτές, οικονομικές και φιλικές προς το περιβάλλον. Τα κοινά ένζυμα που χρησιμοποιούνται είναι οι γλυκοζυλοτρανσφεράσες και οι γλυκοζιτικές υδρολάσες. Αυτά τα ένζυμα είναι υπεύθυνα για τη μεταφορά μορίων γλυκοζυλίου (Ly & Withers 1999). Συγκριτικά με τις γλυκοζυλοτρανσφεράσες, οι γλυκοζιτικές υδρολάσες χρησιμοποιούνται ευρέως λόγω της εμπορικής τους διαθεσιμότητας και της χαμηλής τιμής (Tzortzis & Vulevic 2009).

Η ενζυμική αντίδραση για την παραγωγή των GOS διεξάγεται σε δύο διαφορετικά στάδια, όπως απεικονίζεται και στην Εικόνα 3.2. Το πρώτο στάδιο αποτελεί η μη αναστρέψιμη αντίδραση που περιλαμβάνει το σχηματισμό ενδιαμέσου προϊόντος ενζύμου-γαλακτοζυλομάδας με την ταυτόχρονη απελευθέρωση μίας ομάδας γλυκόζης. Στο δεύτερο

στάδιο πραγματοποιείται η μεταφορά του μορίου γαλακτόζης σε ένα νουκλεόφιλο, πιθανώς σάκχαρο αντί για μόριο νερού, με σκοπό να γίνει η παραγωγή GOS (Zechel & Withers 2001).



Εικόνα 3.2. *Η αντίδραση της τρανγαλακτοζυλίωσης και της υδρόλυσης της λακτόζης με χρήση ενζύμου β-γαλακτοζιδάσης*

Η σύνθεση των GOS από υπόστρωμα λακτόζης είναι μια κινητικά ελεγχόμενη αντίδραση, στην οποία η αντίδραση της υδρόλυσης και της τρανσγαλακτοζυλίωσης συναγωνίζονται μεταξύ τους. Ωστόσο, ο τελικός δέκτης γαλακτοζυλομάδας παίζει σημαντικό ρόλο σε αυτές τις αντιδράσεις. Εάν ο δέκτης είναι νερό, η αντίδραση υδρόλυσης ευνοείται, ενώ εάν υπάρχει ένα άλλο μόριο υδατάνθρακα, προτιμάται η αντίδραση της τρανσγαλακτοζυλίωσης με αποτέλεσμα το σχηματισμό των GOS (Boon et al. 2000, Splechtna et al. 2001).

Η μεταβλητότητα στη δομή των GOS σε σχέση με τη σύνθεση των ολιγοσακχαριτών, τους γλυκοζιτικούς δεσμούς και το βαθμό του πολυμερισμού εξαρτώνται από την πηγή του ενζύμου, το χρόνο αντίδρασης, τη θερμοκρασία και την αρχική συγκέντρωση της λακτόζης (Otieno 2010). Κατά την έναρξη της αντίδρασης, η υψηλή συγκέντρωση λακτόζης ευνοεί την αντίδραση της τρανσγαλακτοζυλίωσης, μεγιστοποιώντας έτσι την απόδοση σε GOS. Παράλληλα, με την αύξηση των GOS, ευνοείται η αντίδραση της υδρόλυσης μειώνοντας τελικά την τελική απόδοση. Είναι εμφανές λοιπόν ότι ο χρόνος της αντίδρασης είναι ο πιο κρίσιμος παράγοντας για να επιτευχθεί η μέγιστη απόδοση σε GOS, αλλά και να είναι εφικτή η παραλαβή του προϊόντος (Torres et al. 2010).

Ομοίως, η θερμοκρασία επηρεάζει την ταχύτητα της αντίδρασης, τη σταθερότητα του ενζύμου και τη διαλυτότητα της λακτόζης. Γενικά, με την αύξηση της θερμοκρασίας, η παραγωγή των GOS αυξάνεται καθώς υπάρχει αύξηση του ρυθμού αντίδρασης και μεγαλύτερη διαλυτότητα της λακτόζης (Vera et al. 2012). Ακόμη, με την αύξηση της θερμοκρασίας αυξάνεται και η ταχύτητα απενεργοποίησης του ενζύμου.

Μεταξύ όλων των άλλων παραγόντων, η προέλευση του ενζύμου είναι επίσης ένας σημαντικός παράγοντας, η οποία μπορεί να είναι είτε βακτηριακή είτε μυκητιακή, όπως αναφέρθηκε σε προηγούμενο κεφάλαιο (Παράγραφος 2.2). Άλλοι παράμετροι όπως η τιμή pH του αντιδρώντος συστήματος, η θερμοκρασία και τα κινητικά χαρακτηριστικά ποικίλλουν από οργανισμό σε οργανισμό. Συνεπώς, η απόδοση του προϊόντος, η σύνθεση και ο τύπος της πηγής της γλυκοζιτικής σύνδεσης των GOS επηρεάζονται από την πηγή του ενζύμου (Playne & Crittenden 2009).

Παράλληλα, τα μη συμβατά μέσα και ο τύπος του αντιδραστήρα έχουν μεγάλες επιπτώσεις στην παραγωγή των GOS (Vera et al. 2016). Η σύσταση του αερίου – οργανικού διαλύτη που χρησιμοποιείται για την παραγωγή των GOS έχει κύρια επίδραση στην απόδοση (Shin & Yang 1994, Bednarski & Kulikowska 2007). Ακόμη, δεδομένου ότι η αντίδραση της τρανσγαλακτοζυλίωσης ευνοείται σε συνθήκες χαμηλής ενεργότητας νερού, χρησιμοποιούνται διφασικά συστήματα για την επίτευξη υψηλότερων αποδόσεων των GOS (Shin & Yang 1994). Ακόμη, παρόλο που η παραγωγή των GOS αυξάνεται με τη χρήση μη συμβατικού μέσου, αυτά τα συστήματα δεν μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την παραγωγή μεγάλης κλίμακας GOS λόγω της μείωσης του ρυθμού αντίδρασης, δεδομένης της διαλυτότητας του συστήματος. Επιπλέον, οι οργανικοί διαλύτες μειώνουν την αστάθεια του ενζύμου και πρέπει να διαχωρίζονται από το προϊόν, αυξάνοντας με αυτό τον τρόπο το κόστος παραγωγής (Dong et al. 2015).

Γενικά, η παραγωγή GOS πραγματοποιείται κυρίως σε αντιδραστήρες διαλείποντος έργου, ώστε το ένζυμο να αδρανοποιείται με θέρμανση, για να σταματήσει η αντίδραση μετά το πέρας του επιθυμητού χρόνου της αντίδρασης. Ωστόσο, ο περιορισμός αυτού του συστήματος έγκειται στην αναστολή της παραγωγής GOS από τη γλυκόζη και τη γαλακτόζη που παράγονται κατά τη διάρκεια της αντίδρασης της υδρόλυσης (Norimasa & Tanaka 1996). Σε αντίθεση με τα παραπάνω, η αναστολή του προϊόντος είναι λιγότερο έντονη από αυτή του αντιδραστήρα συνεχούς έργου, στον οποίο η γλυκόζη και η γαλακτόζη διαχωρίζονται συνεχώς από το μέσο, αυξάνοντας έτσι την απόδοση των GOS (Das et al. 2011). Παρόλο που οι βιοαντιδραστήρες συνεχούς έργου είναι οικονομικά πιο εφικτοί, οι κρίσιμοι παράγοντες αυτού του συστήματος είναι ο χρόνος παραμονής στον αντιδραστήρα, ο ρυθμός ροής της τροφοδοσίας και ο ρυθμός συλλογής διηθήματος, τα οποία πρέπει να ληφθούν υπόψη κατά το σχεδιασμό του βιοαντιδραστήρα. Έτσι, η διαμόρφωση του αντιδραστήρα είναι επίσης ένας από τους παράγοντες που έχουν αντίκτυπο στην παραγωγή GOS.

Τέλος, η φύση του ενζύμου είναι εκείνη που κατέχει επίσης κύριο λόγο στην παραγωγή των GOS. Έτσι, ακατέργαστα, καθαρισμένα, ακινητοποιημένα και ανασυνδυασμένα ένζυμα, σε μορφή ολόκληρων ή διαπερατών κυττάρων εμφανίζουν διαφορετική δράση, αποδίδοντας διαφορετικό μέγιστο στην απόδοση σε GOS (Panesar et al. 2010).

3.2.1.1 Παραγωγή GOS από ολόκληρα κύτταρα

Η αντίδραση για την παραγωγή GOS είναι εφικτό να πραγματοποιηθεί με χρήση ολόκληρων μικροβιακών κυττάρων, η οποία προτιμάται από τα ελεύθερα ένζυμα λόγω της εύκολης διαθεσιμότητά τους, του χαμηλού κόστους παραγωγής τους και της σταθερότητά τους.

Επιπλέον, με τη χρήση ολόκληρων κυττάρων, ξεπερνιέται το πρόβλημα του καθαρισμού κατά την παραλαβή του ενζυμικού προϊόντος (Chockchaisawasdee et al. 2005, Kumari et al. 2013).

3.2.1.2 Παραγωγή GOS από ελεύθερη β-γαλακτοζιδάση

Μεταξύ όλων των πιθανών πηγών μικροβιακής προέλευσης της β-γαλακτοζιδάσης, οι πιο κοινοί μικροοργανισμοί είναι οι *Aspergillus oryzae, Aspergillus niger, Bacillus circulans, Kuyveromyces fragilis* και *Kluyveromyces lactis*. Ο τύπος των συντιθέμενων GOS εξαρτάται από τον μικροοργανισμό-πηγή. Η β-γαλακτοζιδάση από το *B. circulans* έχει αναφερθεί ότι παράγει κυρίως τετρα- και πεντασακχαρίτες, ενώ η β-γαλακτοζιδάση από *A. oryzae* παράγει κυρίως τρισακχαρίτες (Gekas & Lopez-Leiva 1985) με μικρές ποσότητες τετρασακχαριτών (Prenosil et al. 1987). Ομοίως, συντίθενται τρι- και τετρασακχαρίτες όταν η β-γαλακτοζιδάση που χρησιμοποιείται, έχει συντεθεί από *Kluyveromyces* spp. (Prenosil et al. 1987).

3.2.1.3 Παραγωγή GOS από ακινητοποιημένη β-γαλακτοζιδάση

Η ακινητοποίηση του ενζύμου έχει γίνει ένας σημαντικός τομέας έρευνας για τη σύνθεση προϊόντων GOS, καθώς έχει πολλά πλεονεκτήματα έναντι των ελεύθερων ενζύμων όσον αφορά στην επαναχρησιμοποίηση, τη σταθερότητα και την οικονομία της διαδικασίας. Λόγω της σταθερότητας του ακινητοποιημένου ενζύμου, διευκολύνεται ο συνεχής τρόπος παραγωγής, κατά τον οποίο ενισχύεται η καθαρότητα, η ποσότητα και η ποιότητα του τελικού προϊόντος (Panesar et al. 2006). Διαφορετικές τεχνικές όπως ο εγκλεισμός (Mammarella & Rubiolo 2005) και η προσρόφηση (Husain et al. 2011) έχουν διερευνηθεί περαιτέρω για την ακινητοποίηση του ενζύμου και παραγωγή GOS, όπως παρουσιάζονται παρακάτω.

Προσρόφηση

Κατά την τεχνική της προσρόφησης, προτείνεται η σύνθεση των GOS με χρήση ακινητοποιμένης β-γαλακτοζιδάσης σε αντιδραστήρα συνεχούς έργου, ενισχυμένο με βαμβακερό ύφασμα. Με χρήση β-γαλακτοζιδάσης από *A. oryzae* και υπόστρωμα λακτόζης 20%, παρατηρήθηκε δημιουργία τρισακχαριτών ως κύριοι παραγόμενοι GOS, ενώ παρατηρήθηκε η δημιουργία τετρα- και πεντασακχαριτών, με μικρότερη ποσότητα παραγόμενων εξασακχαριτών, σε υψηλότερες τιμές απόδοσης μετατροπής σε GOS. Λόγω των ιδιοτήτων του βαμβακερού υφάσματος, όπως είναι το μεγάλο πορώδες, η υψηλή μηχανική αντοχή, η μεγάλη επιφάνεια και η χαμηλή πίεση, η χρήση του κρίνεται ως αποτελεσματική για τη μεγιστοποίηση της απόδοσης της ενζυμικής αντίδρασης (Albayrak & Yang 2002). Γενικά, η προσρόφηση είναι μια απλή τεχνική, η οποία μπορεί επίσης να εφαρμοστεί για την ακινητοποίηση και άλλων ενζύμων, μεγιστοποιώντας την απόδοση της αντίδρασης, ενώ παράλληλα προτιμάται για την ευκολία και το χαμηλό της κόστος (Guleç et al. 2010).

Εγκλεισμός

Η β-γαλακτοζιδάση ακινητοποιήθηκε σε διαφορετικές μήτρες με την τεχνική του εγκλεισμού, με σκοπό να ελεγχθεί η ταυτόχρονη παραγωγή GOS. Παρατηρήθηκε ότι, είναι εφικτή η

απόδοση 344 g/L σε GOS, για εγκλεισμό σε μήτρα πολυβινυλικής αλκοόλης (Polyvinyl Alcohol, PVA). Σε αυτή την περίπτωση, αναγνωρίστηκε η παραγωγή κυρίως τρι- και τετρασακχαριτών, ενώ προτάθηκε η χρήση αυτής της μεθόδου για παραγωγή GOS μεγάλης κλίμακας (Panesar et al. 2018). Οι κυριότεροι μικροοργανισμοί που έχουν χρησιμοποιηθεί για την ταυτόχρονη παραγωγή β-γαλακτοζιδάσης και GOS σε συστήματα βιοαντιδραστήρων παρουσιάζονται στον Πίνακα 3.1.

3.3 Απομόνωση και καθαρισμός γαλακτοολιγοσακχαριτών

Κατά τη διάρκεια της παραγωγής, εκτός από τους γαλακτοολιγοσακχαρίτες που παράγονται, υπάρχουν στο μίγμα της αντίδρασης και άλλα σάκχαρα, όπως γλυκόζη, γαλακτόζη και μη υδρολυμένη λακτόζη. Συνεπώς, απαιτούνται τεχνικές που να είναι αποδοτικές, απλές και οικονομικά ωφέλιμες για τον διαχωρισμό των GOS από τα υπόλοιπα συστατικά, χαμηλότερου μοριακού βάρους. Για το λόγο αυτό, έχουν διερευνηθεί διάφορες μέθοδοι για την εκχύλιση των GOS, όπως η κατεργασία με ενεργό άνθρακα, η κλασματική υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης, η χρωματογραφία αποκλεισμού μεγέθους και η εκχύλιση στερεάς φάσης. Τα χαρακτηριστικά καθεμίας από της μεθόδους διαχωρισμού των GOS παρουσιάζονται στον Πίνακα 3.2 (Panesar et al. 2018).

3.4 Παγκόσμια αγορά GOS

Λόγω της αυξανόμενης ζήτησης των καταναλωτών για τρόφιμα που προάγουν την υγεία, η ζήτηση για λειτουργικά τρόφιμα, συμπεριλαμβανομένων αυτών που περιέχουν πρεβιοτικά συστατικά, έχει αυξηθεί σημαντικά. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα να παρατηρείται μία αυξανόμενη ζήτηση και επομένως και παραγωγή των GOS, ιδίως σε χώρες με μεγάλες πληθυσμούς, όπως αυτές της Ασίας.

Σύμφωνα με τις εκτιμήσεις που έγιναν το 1994-1995, η ετήσια παγκόσμια παραγωγή γαλακτοολιγοσακχαριτών ήταν 12.000-14.000 tn, η οποία αυξήθηκε σε 21.000 tn το 2009 (Playne & Crittenden 2009). Στην Ιαπωνία και την Ευρώπη, οι GOS χρησιμοποιούνται ως συστατικά τροφίμων τα τελευταία 30 χρόνια, ενώ οι εφαρμογές τους επεκτείνονται καθημερινά. Ακόμη, ενώ οι ιαπωνικές εταιρείες εξακολουθούν να κυριαρχούν στην παγκόσμια παραγωγή γαλακτοολιγοσακχαριτών, η ευρωπαϊκή αγορά τείνει να επεκταθεί επίσης στον τομέα της παραγωγής γαλακτοολιγοσακχαριτών. Η έκθεση της Grand View Research Inc., στις ΗΠΑ, αποκάλυψε ότι η Ευρώπη κατείχε το μεγαλύτερο μερίδιο αγοράς το 2015 στην παραγωγή βρεφικής τροφής πλούσιας σε πρεβιοτικά τα τελευταία χρόνια. Επιπλέον, εκτιμάται ότι η ζήτηση για κατανάλωση και παραγωγή GOS στην αγορά της Κίνας θα φθάσει τους 10.000 tn ετησίως τα επόμενα χρόνια.

Πίνακας 3.1. *Ενζυμικές μέθοδοι παραγωγής GOS*

Τύπος βιοκαταλύτη	Πηγή ενζύμου	Αρχική συγκέντρωση λακτόζης* ($g \cdot L^{-1}$)	Απόδοση ($g \cdot L^{-1}$)	Παραγωγικότητα ($g \cdot L^{-1} \cdot h^{-1}$)	% GOS
Ολόκληρα κύτταρα	*Bifidobacterium bifidum* NCIMB 4117	450-500	85-115	-	36-43
	Lactobacillus plantarum	400	340	28,3	34
	Kluyveromyces lactis	400	177	-	44
	Pseudozyma tsukubaensis	400	63	-	15,7
Ελεύθερο ένζυμο	*Kluyveromyces lactis*	400	120	-	29,9
	Bullera singularis KCTC 7534	180	90	-	50
	Lactobacillus reuteri	205	-	13	38
	Lactobacillus acidophilus R22	205	-	70	38,5
	Bifidobacterium longum	400	-	-	32,5
	Talaromyces thermophilus	200	100	-	50
	Aspergillus oryzae	400	135	-	-
	Kluyveromyces lactis	2,1	7,0	-	15,2
	Bacillus circulans	400	-	-	41
Ακινητοποιημένο ένζυμο	*Talaromyces thermophilus*	200	100	-	50
	Aspergillus oryzae	400	-	106	26
	Bacillus circulans	550	-	-	69
	Thermotoga maritima	250	-	-	8
	Lactobacillus plantarum	300	-	-	34
	Aspergillus oryzae	400	-	334	45
	Kluyveromyces marxianus NCIM 355	200	64	-	-
	Bullera singularis	300	165	4,8	54
	Kluyveromyces lactis	400	26	186	-
	Bacillu spp.	330	110	-	34
	Bifidobacterium bifidum NCIMB 4117	430	135	-	49-53
Ανασυνδυασμένο ένζυμο	*Sulfolobus solfataricus*	270	102	-	41
	Thermus spp.	-	-	-	40
	Halothermothrix orenii	200	51	-	30

* Διαλυτότητες λακτόζης μεγαλύτερες των 200g/L έχουν επιτευχθεί με διαλύση σε μέσα διαφορετικά του νερού ή σε θερμοκρασίες μεγαλύτερες των 25°C.

Πίνακας 3.2. *Μέθοδοι διαχωρισμού GOS*

Μέθοδος	Συνθήκες απομόνωσης GOS	Ανάκτηση των GOS (%)
Επεξεργασία ενεργού άνθρακα	Εξισορροπείται στήλη ενεργού άνθρακα με νερό και στη συνέχεια ρυθμίζεται κλιμακωτή ροή αιθανόλης	35
	Παραμονή του μίγματος σε διάλυμα αιθανόλης 10% για 30 min	90
	Σε στήλη ενεργού άνθρακα (charcoal-celite) (3x50 cm), ρυθμίζεται ροή με νερό και στη συνέχεια κλιμακωτή ροή 0-30% αιθανόλη-νερό, με ρυθμό ροής 4 mL/min	39,79
Χρωματογραφία αποκλεισμού μεγέθους	Σε στήλη απλή BiogelP2 ρυθμίζεται ροή νερού, με ροή 0.25 mL/min	81-92
	Σε στήλη Bio-Gel P-2 (100x2.6 cm), θερμοκρασίας 60°C, ρυθμίζεται ροή νερού με ρυθμό ροής 0,3 mL/min	99
	Σε στήλη Bio-Gel P-2 (100x2.6 cm), θερμοκρασίας 25°C, ρυθμίζεται ροή νερού με ρυθμό ροής 0,16 mL/min	99
	Σε όργανο που περιέχει 3 σειριακά συνδεδεμένες στήλες HiLoad 26/60 superdex 30. Διάλυμα αιθανόλη-νερό 0,5% (v/v) χρησιμοποιείται ως διαλύτης, με ρυθμό ροής 1 ml/min, σε ρυθμιζόμενη θερμοκρασία 35°C	99
Νανοδιήθηση	Σε μεμβράνη νανοδιήθησης (NF-270), μοριακής μάζας αποκοπής 400 Da, θερμοκρασίας 45°C και πίεση 0,4 MPa	26,8
	Σε μεμβράνη NP030, θερμοκρασίας 5°C και πίεση 45 bar	85
Κλασματική υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης	Σε θερμοκρασία 25°C, στήλη ρητίνης NA^+ και K^+ με διασταυρούμενη σύνδεση 4% και παροχή 0,3 mL/min	98
	Σύστημα χρωματογραφίας CSEP C916 εφοδιασμένο με 8 στήλες Eurokat Na σε σειρά, σε θερμοκρασία 60°C και διαλύτη νερό	99,9
Χρωματογραφία κατιονανταλλαγής	Διανομέας κατιόντων Diaion UBK 530, με νερό ως μέσον έκλουσης και ακετόνη ή δεξτράνη ως διαλυτή ανιχνευτής, ρυθμό ροής 0,5 mL/min και θερμοκρασία 30°C	90
	Εναλλάκτης κατιόντων: Dowex 50WX4-400 σε θερμοκρασία 25°C	-
Εκχύλιση στερεάς φάσης	Χρήση CO_2 ως διαλύτη, μαζί με παροχή δεύτερου διαλύτη αιθανόλη-νερό (95:5) με ρυθμό ροής 0,6 mL/min, πίεση 150 bar και θερμοκρασία 80°C	75
Μικροβιακή ζύμωση	Με χρήση ενζύμου: 1. *Saccharomyces cerevisiae* NCDC 50 (1%, 37°C, 18 h) 2. *Kluyveromyces marxianus* NCDC 115 (1%, 37°C, 8 h) 3. *Lactobacillus helveticus* NCDC 288 (1%, 37°C, 8 h)	91,71
	Με χρήση ενζύμου *Kluyveromyces marxianus* σε αναλογία 1,55 g ενζύμου/g σακχάρων στο μίγμα, σε θερμοκρασία 40°C και pH=5.5	95

Σύμφωνα με την έκθεση της Global Industries Analysts, η αξία των πρεβιοτικών συστατικών είχε προβλεφθεί στα 1,17 δις. δολάρια το 2015 λόγω της μεγάλης ποσότητας συστατικών όπως η λακτοφερίνη και οι GOS. Περαιτέρω, η παραγωγή ολιγοσακχαριτών εκτιμάται ότι είναι 50.000-80.000 tn ετησίως, εκ των οποίων οι GOS αποτελούν το 40% της ετήσιας παραγωγής (Jürgen & Klaus 2010). Η αγορά των Global GOSs το 2013 ανερχόταν στους 94,1 Ktn και αναμένεται να αυξηθεί περαιτέρω στους 175,7 Ktn μέχρι το 2020, σημειώνοντας αύξηση της τάξης του 9,3% σύμφωνα με τον εκτιμώμενο ετήσιο ρυθμό ανάπτυξης (Cooper 2015).

3.5 Εμπορικά διαθέσιμοι GOS

Διάφορες εταιρείες έχουν ξεκινήσει την παραγωγή νέων προϊόντων, επεξεργαζόμενες τις νέες στρατηγικές για την ενσωμάτωση των GOS σε διάφορα τρόφιμα όπως ζελέ, ζάχαρη και γάλα. Ανάμεσα στις πιο γνωστές εταιρείες που παράγουν GOS είναι οι Yakult Honsha (Τόκιο, Ιαπωνία), Nissin Sugar Manufacturing Company (Τόκιο, Ιαπωνία), Snow Brand Milk Products (Τόκιο, Ιαπωνία), Friesland Foods Domo, πρώην Borculo Domo ingredients (Ολλανδία) και η Clasado Ltd. (ΗΠΑ). Τα προϊόντα GOS που παράγονται σε αυτές τις εταιρείες είναι κυρίως με τη μορφή σκόνης και σιροπιών. Στα πιο γνωστά σκευάσματα ανήκει το Bioligo GL5700 GOS, ένα εμπορικό σκεύασμα με συγκέντρωση GOS 57% επί ξηρού βάρους, που εισάγεται στην αγορά από την Ingredion Inc., με έδρα στη Νότια Κορέα. Ακόμη, η Dairy Crest, με έδρα το Ηνωμένο Βασίλειο έχει ξεκινήσει τη δημιουργία ενός καινοτόμου προϊόντος βρεφικού γάλακτος με αφαλατωμένο ορό γάλακτος ως πηγή πρωτεΐνης και παρουσία υδατανθράκων, με την επωνυμία «SureStart». Άλλα καινοτόμα προϊόντα GOS είναι τα "Promovita" και "Nutrabiotic", τα οποία προορίζονται για τη διατροφή των ανθρώπων και των ζώων, αντίστοιχα (Πίνακας 3.3). Άλλες βιομηχανίες, όπως η Nestle και η Loblaw, εμφανίστηκαν επίσης στον τομέα της ενίσχυσης των προϊόντων διατροφής για παιδιά, με την κυκλοφορία του Nestle Good Start 2 και του Omega + Infant Powder Formula, αντίστοιχα.

3.6 Τα οφέλη των GOS στην υγεία του ανθρώπου

Οι GOS παρέχουν πολλά οφέλη στην υγεία του ανθρώπου, μέσω δύο κύριων μηχανισμών, τον επιλεκτικό πολλαπλασιασμό των ευεργετικών βακτηρίων της εντερικής μικροχλωρίδας και την παραγωγή λιπαρών οξέων βραχείας αλυσίδας (Short Chain Fatty Acids – SCFAs). Με τον επιλεκτικό πολλαπλασιασμό των βακτηρίων, κυρίως του γένους των Bifidobacteria και Lactobacilli παρέχεται αντίσταση κατά της ανάπτυξης των παθογόνων μικροοργανισμών, μειώνονται οι εξωγενείς και ενδογενείς εντερικές λοιμώξεις, ρυθμίζεται το ανοσοποιητικό σύστημα και καταστέλλεται η φλεγμονή του εντέρου.

Με το δεύτερο μηχανισμό, ο μεταβολισμός των GOS οδηγεί στην παραγωγή SCFAs. Τα SCFAs παρουσιάζουν διάφορα ευεργετικά αποτελέσματα, όπως τη μείωση του κινδύνου εμφάνισης καρκίνου, της αύξησης απορρόφησης μετάλλων, τη βελτίωση της λειτουργίας του εντέρου αλλά και του ελέγχου του επιπέδου των λιπιδίων του αίματος.

Πίνακας 3.3. *Οι πιο γνωστοί εμπορικά διαθέσιμοι GOS*

Εμπορικό όνομα GOS	Μορφή GOS	Προμηθευτής	Συγκέντρωση GOS (%)
Oligomate 55	Σιρόπι/ Σκόνη	Yakult Honsha Co. Ltd. Japan	55
Cup-Oligo	Υγρή/ Σκόνη	Nissin Sugar Co. Ltd. Japan	70
Vivinal GOS	Σιρόπι	Friesland Campina Domo, Netherlands	59-72
Vivinal GOS	Σκόνη		69
Vivinal GOS Powder WPC/ Vivinal GOS Powder Maltodextrin	Σκόνη		29
Bimuno	Σκόνη	Clasado Biosciences Ltd., UK	>80
Bimuno	Σιρόπι		>57
Promovita	Σιρόπι	Dairy Crest limited, UK	-
Bioligo GL 5700 IMF	Σιρόπι	Ingredion Inc., Korea	57
GOS-570-S	Σιρόπι	Biotechnology Corporation, China	57
Purimune	-	Corn Products International Inc., USA	90

3.7 Υφιστάμενες επιστημονικές μελέτες της ενζυμικής βιομετατροπής της λακτόζης σε GOS

Η παρούσα διπλωματική εργασία εξετάζει την αξιοποίηση του όξινου ορού προς παραγωγή γαλακτοολιγοσακχαριτών, που είναι συστατικά υψηλής προστιθέμενης αξίας, δίνοντας παράλληλα μία λύση στην αντιμετώπιση του προβλήματος της συσσώρευσης των αποβλήτων της βιομηχανίας γιαουρτιού. Η εισαγωγή μιας τέτοιας γραμμής παραγωγής στη βιομηχανία είναι πολλά υποσχόμενη, καθώς δίνεται η δυνατότητα στην ίδια τη βιομηχανία να επεξεργάζεται τα απόβλητά της και να τα αξιοποιεί για την παραγωγή καινοτόμων προϊόντων. Έτσι, επιλύεται ένα από τα μεγαλύτερα προβλήματα της βιομηχανίας γιαουρτιού, ενώ παράλληλα αυξάνεται το κέρδος της. Παρακάτω αναφέρονται οι πιο πρόσφατες μελέτες σχετικά με την αξιοποίηση της λακτόζης προς σχηματισμό γαλακτοολιγοσακχαριτών.

Οι Fischer και Kleinschmidt (2018) μελέτησαν το συνδυασμό δύο β-γαλακτοζιδασών για τη σύνθεση γαλακτοολιγοσακχαριτών (GOS) και αξιολογήθηκε το προϊόν όσον αφορά στην ολική απόδοση και τη δομή των GOS. Επιλέχθηκαν οι συνδυασμοί του *Aspergillus oryzae* με *Cryptococcus laurenti* και *Aspergillus oryzae* με *Kluyveromyces lactis*, με σκοπό να εξεταστεί η επίδραση της προέλευσης των ενζύμων στην απόδοση της ενζυμικής αντίδρασης και της παραγωγής του τελικού προϊόντος. Ούτε η συνεχής ούτε η ταυτόχρονη σύνθεση με ένζυμο από *A. oryzae* και *C. laurentii* οδήγησε σε αυξημένη απόδοση σε GOS. Ωστόσο, με την ταυτόχρονη σύνθεση, η σύνθεση των ανωτέρω μονάδων GOS αυξήθηκε από 38,5% σε 40%, με παραγωγή τετρα- και πεντασακχαριτών, οι οποίοι αυξήθηκαν από 6,7% σε 12,8% και από 0,4% σε 3,3%, αντίστοιχα. Επιπλέον, λόγω της διαφορετικής εκλεκτικότητας των δύο β-

γαλακτοζιδασών όσον αφορά στη δημιουργία γλυκοζιτικού δεσμού, η δομική ποικιλία των προϊόντων των τελικών GOS αυξάνεται. Με τη χρήση ενζύμων από *K. lactis* και *A. oryzae* η συνολική απόδοση σε GOS αυξήθηκε από 24,6% σε 33,1%, η οποία οφείλεται κυρίως στη διαμόρφωση των GOS σε δισακχαρίτες. Από την άλλη, η χρήση ενζύμου από *A. oryzae* ως δεύτερο ένζυμο της ενζυμικής αντίδρασης οδήγησε σε αποικοδόμηση των δι- και τρισακχαριτών, με μείωση της απόδοσης σε GOS, παρόλο που η απόδοση των τετρασακχαριτών μπορεί να αυξηθεί. Συμπερασματικά, με τους ανωτέρω συνδυασμούς ενζύμων που μελετήθηκαν, ήταν δυνατόν να αυξηθεί η απόδοση σε GOS και να μειωθεί η περιεκτικότητα της υπολειμματικής λακτόζης του τελικού μίγματος. Έτσι, η χρήση περισσότερων β-γαλακτοζιδασών, διαφορετικής μικροβιακής προέλευσης, αποτελεί ένα ενδιαφέρον ερευνητικό πεδίο στη σύνθεση των GOS, το οποίο οφείλει να διερευνηθεί εκτενέστερα στο μέλλον.

Οι Gonzalez-Delgado et al. (2016) ασχολήθηκαν με τη βελτιστοποίηση της σύνθεσης γαλακτοολιγοσακχαριτών (GOS) που καταλύεται από εμπορική β-γαλακτοζιδάση από *Kluyveromyces lactis*. Συγκεκριμένα, μελέτησαν την επίδραση των κύριων παραγόντων όπως η θερμοκρασία, η συγκέντρωση ενζύμου, το pH, η αρχική συγκέντρωση λακτόζης και ο χρόνος αντίδρασης, ως προς την παραγωγή των πλέον επιθυμητών γαλακτοολιγοσακχαριτών. Βρέθηκε ότι η μέγιστη απόδοση σε GOS που επιτεύχθηκε ήταν ίση με 12.2% σε θερμοκρασία 40°C, συγκέντρωση ενζύμου 5 U/mL, pH=7,0, 250 g/L αρχική συγκέντρωση λακτόζη και 3 ώρες χρόνο αντίδρασης. Από τα αποτελέσματα της συγκεκριμένης έρευνας προέκυψε ότι το pH είναι μια κρίσιμη παράμετρος που επηρεάζει τόσο την απόδοση της τρανσγαλακτοζυλίωσης, όσο και της υδρόλυσης, ανάλογα με την ενεργότητα του ενζύμου που χρησιμοποιείται.

Παλαιότερα, οι Fischer και Kleinschmidt (2015) μελέτησαν την παραγωγή γαλακτο-ολιγοσακχαριτών τόσο από όξινο όσο και από γλυκό ορό, καθώς και από διάλυμα πρότυπης λακτόζης μέσω ενζυμικής αντίδρασης. Πραγματοποίησαν ενζυμικές αντιδράσεις με β-γαλακτοζιδάση από δύο διαφορετικούς μικροοργανισμούς, τον *Aspergillus oryzae* και τον *Kluyveromyces lactis* και μελέτησαν τις βέλτιστες συνθήκες της αντίδρασης. Από τις μελέτες τους προέκυψε ότι τόσο ο γλυκός όσο και ο όξινος ορός μπορούν να αποτελέσουν υπόστρωμα για την παραγωγή GOS. Το ένζυμο που προέρχεται από τον *A. oryzae* δεν φάνηκε να δέχεται κάποιου είδους παρεμπόδιση. Χαρακτηριστικά, σε αρχική συγκέντρωση λακτόζης 38 g/L, το ένζυμο από τον *A. oryzae* έδωσε απόδοση σε GOS 10,9±0,01% σε πρότυπο διάλυμα λακτόζης, 10,9±0,18% σε γλυκό ορό γάλακτος και 11,3±0,59% σε όξινο ορό. Όπως φαίνεται, η αντίδραση τρανσγαλακτοζυλίωσης δεν επηρεάστηκε από τη σύσταση των διαλυμάτων. Η λακτάση από τον *K. lactis* παρουσιάζει ευαισθησία στην περιεκτικότητα του ορού σε κατιόντα και η δράση της παρεμποδίζεται από τα άλατα. Σε αρχική συγκέντρωση λακτόζης 38 g/L, οι αποδόσεις σε GOS ήταν 10,9±0,26% σε πρότυπο διάλυμα λακτόζης, 4,30±0,17% σε γλυκό ορό και 10,6±0,41% σε όξινο ορό. Ωστόσο, με αύξηση της αρχικής συγκέντρωσης λακτόζης φάνηκε να μην υπάρχει σημαντικός βαθμός παρεμπόδισης.

Οι Rodriguez-Colinas et al. (2014) μελέτησαν την παραγωγή GOS από λακτόζη αποβουτυρωμένου γάλακτος, χρησιμοποιώντας β-γαλακτοζιδάση από διαφορετικούς μικροοργανισμούς, όπως *Bacillus circulans, Kluyveromyces lactis* και *Aspergillus oryz*ae, σε θερμοκρασίες 4°C και 40°C. Η μέγιστη απόδοση σε GOS (40-50%) εμφανίστηκε στις

περιπτώσεις των ενζύμων από *B. circulans* και *A. oryzae*, ενώ στην περίπτωση β-γαλακτοζιδάσης από τον *K. lactis* η κατανάλωση της λακτόζης έφτασε το 95%. Η μέγιστη παραγωγή GOS επιτεύχθηκε με το ένζυμο από τον *K. lactis* (7,0 g/L), ενώ η μικρότερη στην περίπτωση της β-γαλακτοζιδάσης από *A. oryzae* (4,5 g/ L). Χρησιμοποιώντας ποσότητα ενζύμου 0,1% v/v, η μέγιστη συγκέντρωση GOS με β-γαλακτοζιδάση από *K. lactis* επιτεύχθηκε σε 1 h στους 40°C και στις 5 h στους 4°C. Με τη χρήση αυτού του ενζύμου ήταν δυνατό να παρασκευαστεί γάλα με 7,0 g/L περιεκτικότητα σε GOS (οι ολιγοσακχαρίτες του μητρικού γάλακτος - Human Milk Oligosaccharides, HMOs - βρίσκονται σε συγκέντρωση 515 g/L), ενώ η περιεκτικότητα του επεξεργασμένου γάλακτος σε λακτόζη ήταν πολύ χαμηλή, σχεδόν 2,1 g/L (η αρχική περιεκτικότητα του γάλακτος σε λακτόζη ήταν 44-46 g/L). Τέλος, βρέθηκε ότι, με τη β-γαλακτοζιδάση από *K. lactis*, οι κύριοι GOS που παρασκευάστηκαν ήταν η 6-γαλακτοβιόζη (6-galactobiose: Gal-b(1→6)Gal), η αλλολακτόζη (allolactose: Gal-b(1 →6)-Glc) και η 6΄-O-β-γαλακτοσυλλακτόζη (6΄-O-b-galactosyl-lactose: Gal-b(1→6)-Gal-b(1→4)-Glc).

Οι Urrutia et al. (2013) μελέτησαν την παραγωγή GOS ενζυμικά, με το ένζυμο της β-γαλακτοζιδάσης από *A. oryzae* σε υπόστρωμα πρότυπου διαλύματος λακτόζης. Σε υπόστρωμα με περιεκτικότητα 400 g/L σε λακτόζη, με 15 U/mL ενζύμου, στους 40°C και τιμή pH υποστρώματος 4,5 παρατηρήθηκε μέγιστη απόδοση σε GOS ίση με 26,8 % w/w, ενώ η μετατροπή λακτόζης βρέθηκε ίση με 70%. Στη συγκεκριμένη μελέτη εντοπίστηκε σχηματισμός 17 διαφορετικών υδατανθράκων, με την 6΄-O-β-γαλακτοσυλ-λακτόζη να είναι το κύριο προϊόν αποτελώντας το 1/3 (κ.β.) των συνολικών συντιθέμενων GOS. Επίσης, με τη συγκεκριμένη μελέτη αποδείχθηκε ότι η β-γαλακτοζιδάση από *A. oryzae* σχηματίζει β-(1→6), β(1→3) και β (1→4) γλυκοζιτικούς δεσμούς, ενώ η θερμοκρασία και το pH του υποστρώματος δεν φάνηκε να επιδρούν στη μεγιστοποίηση της παραγωγής των GOS, σε αντίθεση με την επίδραση του υποστρώματος λακτόζης, που είναι ένας καθοριστικός παράγοντας για την αντίδραση. Τέλος, παρατηρήθηκε ότι η προέλευση του ενζύμου έχει ιδιαίτερη σημασία στον τύπο των GOS που θα παραχθούν και στην απόδοση της αντίδρασης, καθώς τα αποτελέσματα της παραπάνω μελέτης συγκρίθηκαν με άλλες, που αφορούν στη δράση της β-γαλακτοζιδάσης από *Kluyveromyces lactis* και *Bacillus circulans*, όπου και παρατηρήθηκε ότι με τη χρήση της τελευταίας εμφανίζονται μεγαλύτερες αποδόσεις σε GOS.

Οι Iqbal et al. (2010) παρήγαγαν καθαρή β-γαλακτοζιδάση από *Lactobacillus plantarum* WCFS1, μελέτησαν τις ιδιότητες του ενζύμου, και στη συνέχεια ερεύνησαν την παραγωγή γαλακτοολιγοσακχαριτών από αυτό, σε υπόστρωμα πρότυπου διαλύματος λακτόζης. Όσον αφορά στη μελέτη τους για την παραγωγή GOS, βρήκαν ότι η μέγιστη απόδοση σε GOS ήταν 41% w/w, με 85% μετατροπή της λακτόζης σε υπόστρωμα πρότυπου διαλύματος λακτόζης συγκέντρωσης 600 mM, θερμοκρασία 37°C, pH=6,5 και δραστικότητα ενζύμου 1 U/mL. Κατά την αντίδραση τρανσγαλακτοζυλίωσης, το ένζυμο φάνηκε να σχηματίζει γλυκοζιτικούς δεσμούς β-(1→6), σε ποσοστό 80% και β(1→3) σε ποσοστό 9%. Τα κύρια προϊόντα γαλακτοολιγοσακχαριτών που σχηματίστηκαν ήταν ο τρισακχαρίτης b-D-Galp(1→6)-D-Lac, σε ποσοστό 34% των συνολικών GOS, και ο δισακχαρίτης b-D-Galp(1→6)-D-Glc, σε ποσοστό μεγαλύτερο από 29% των συνολικών GOS.

Οι Spletcha et al. (2007) μελέτησαν την ενζυμική παραγωγή GOS με β-γαλακτοζιδάση από τον *Lactobacillus reuteri* σε διεργασίες διαλείποντος και συνεχούς έργου και βρήκαν ότι οι

δύο τύποι διεργασιών παρουσιάζουν σημαντικές διαφορές ως προς την απόδοση παραγωγής σε GOS. Σε θερμοκρασία 37°C, pH=6,0 και συγκέντρωση υποστρώματος λακτόζης 600 mM, στην περίπτωση της διεργασίας διαλείποντος έργου η απόδοση σε GOS ήταν 36%, με μετατροπή της λακτόζης 80%, ενώ στην περίπτωση της συνεχούς λειτουργίας, η απόδοση σε GOS ήταν 24%, με 50% μετατροπή της λακτόζης. Η παραγωγή των GOS ήταν χαμηλότερη κατά τη συνεχή διεργασία, λόγω της χαμηλότερης παραγωγής τρισακχαριτών και τετρασακχαρτών στο διάλυμα της αντίδρασης. Ωστόσο, η επιλεκτικότητα του ενζύμου στον σχηματισμό δεσμού β(1→6) στην περίπτωση της συνεχούς διεργασίας, σε σχέση με την ημισυνεχή διεργασία κατά την οποία το ένζυμο σχηματίζει β(1→6) και β(1→3) δεσμούς, έχει ως αποτέλεσμα η συνεχής διεργασία να παρουσιάζει το πλεονέκτημα του πιο εξειδικευμένου προϊόντος.

Οι Reuter et al. (1999) μελέτησαν την σύνθεση γαλακτοολιγοσακχαριτών ενζυμικά με β-γαλακτοζιδάση από διαφορετικούς μικροοργανισμούς, *Sulfolobus solfataricus, Aspergillus oryzae* και *Escherihia coli*. Στόχος ήταν η σύγκριση της συνθετικής δυναμικότητας της β-γαλακτοζιδάσης από τον *S. solfataricus*, η οποία είναι σταθερή, με εμπορικά διαθέσιμη β-γαλακτοζιδάση από *A. oryzae* που είναι θερμοσταθερή, και με εμπορικά διαθέσιμη β-γαλακτοζιδάση από *E. coli* η οποία δεν εμφανίζει θερμοσταθερότητα. Η σύνθεση GOS μελετήθηκε σε ένα εύρος θερμοκρασιών και για την αντίδραση της τρανσγαλακτοζυλίωσης, ως δότης μονομερών χρησιμοποιήθηκε η λακτόζη, ενώ ως δέκτης N-ακετυλλακτοζαμίνη (GlcNAc). Οι θερμοκρασίες που μελετήθηκαν ήταν οι 75 και 65°C στην περίπτωση της β-γαλακτοζιδάσης από *S. solfataricus*, 60 και 50°C για προέλευση ενζύμου από τον *A. oryzae,* και τέλος 37 και 30°C για την περίπτωση ενζυμικής αντίδρασης με β-γαλακτοζιδάση από *E. coli*, ενώ η συγκέντρωση της λακτόζης μελετήθηκε από 50 mM έως 1 M και η συγκέντρωση της GlcNAc από 10 mM έως 1 M. Η δραστικότητα του ενζύμου που χρησιμοποιήθηκε ήταν 1 U/mL. Η τιμή του pH της αντίδρασης ήταν 7,0 για την περίπτωση προέλευσης της β-γαλακτοζιδάσης από *S. solfataricus*, 4,8 για την περίπτωση από *A. oryzae* και 7,3 για την περίπτωση από *E. coli*. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι το ένζυμο από *S. solfataricus* οδήγησε σε υψηλότερες αποδόσεις (48%) στους 65°C, με 1 M λακτόζη και 1 M GlcNAc, ακολουθούμενο από το ένζυμο από τον *A. oryzae* (36% απόδοση) στους 60°C με 1 M λακτόζη και 1 M GlcNAc, ενώ την χαμηλότερη απόδοση έδωσε η αντίδραση με τη β-γαλακτοζιδάση από *E. coli* (32%) στους 37°C με 500 mM λακτόζη και 500 mM GlcNAc. Τα κύρια προϊόντα που λήφθηκαν από την ενζυμική αντίδραση με τη β-γαλακτοζιδάση από τον *S. solfataricus* ήταν οι δισακχαρίτες b-D-Gal-[1-6]-DGlcNAc, b-D-Gal-[1-4]-D-GlcNAc και κάποιοι ολιγοσακχαρίτες.

Όπως φαίνεται από τα παραπάνω, οι μελέτες που αφορούν στην παραγωγή GOS από όξινο ορό είναι πολύ λίγες σε σχέση με τις αντίστοιχες μελέτες σε πρότυπα συστήματα λακτόζης. Ο λόγος που η αξιοποίηση συγκεκριμένα του όξινου ορού, ως υπόστρωμα λακτόζης, είναι τόσο σημαντική είναι η χαμηλή τιμή pH του, που τον καθιστά επιβλαβή για το περιβάλλον και δύσκολα διαχειρήσιμο προς άλλες κατευθύνσεις, ενώ παράλληλα θεωρείται κατάλληλος για υπόστρωμα σε ενζυμικές αντιδράσεις προς παραγωγή GOS.

Κεφάλαιο 4ο
Πειραματικός σχεδιασμός-Υλικά και μέθοδοι

4.1 Σκοπός και στόχοι

Η παρούσα διπλωματική εργασία έχει ως στόχο τη διερεύνηση της παραγωγής γαλακτοολιγοσακχαριτών από όξινο ορό, ένα απόβλητο της γαλακτοβιομηχανίας πλούσιο σε λακτόζη, πρωτεΐνες και άλατα, που όμως η αξιοποίησή του καθίσταται προβληματικη λόγω της υψηλής περιεκτικότητάς του σε γαλακτικό οξύ και επομένως της ιδιαίτερα χαμηλής του τιμής pH. Στη συγκεκριμένη εργασία μελετάται η αξιοποίηση της λακτόζης του όξινου ορού, με σκοπό τη μετατροπή της σε γαλακτοολιγοσακχαρίτες (Galacto-oligosaccharides, GOS). Η μετατροπή της λακτόζης σε GOS γίνεται μέσω ενζυμικής αντίδρασης με χρήση του ενζύμου της β-γαλακτοζιδάσης από *Kluyveromyces lactis*, το οποίο διασπά τη λακτόζη στα μονομερή της, τα οποία στη συνέχεια αποτελούν υπόστρωμα για τον σχηματισμό των GOS μέσω της δράσης του ίδιου ενζύμου. Στη συνέχεια, τα αποτελέσματα αυτά, συμπεριλαμβανομένου της απόδοσης της μετατροπής, συγκρίθηκαν με προηγούμενα αποτελέσματα της ενζυμικής αντίδρασης του ενζύμου της β-γαλακτοζιδάσης από *Aspergillus oryzae*.

Τα βήματα που ακολουθήθηκαν για την επίτευξη αυτού του σκοπού περιλαμβάνουν:

I. την παραλαβή του όξινου ορού
II. την προετοιμασία του όξινου ορού σε κατάλληλο υπόστρωμα για την ενζυμική αντίδραση
III. την ενζυμική αντίδραση
IV. την παραλαβή των δειγμάτων της ενζυμικής αντίδρασης και την ανάλυσή τους μέσω Υγρής Χρωματογραφίας Υψηλής Απόδοσης (High Performance Liquid Chromatography, HPLC) και Χρωματογραφίας Ανιονεναλλαγής Υψηλής Απόδοσης με Παλμικό Αμπερομετρικό Ανιχνευτή (High Performance Anion-Exchange Chromatography-Pulsed Amperometric Detection, HPAEC-PAD)

Οι βασικοί στόχοι της παρούσας εργασίας αφορούσαν στη μελέτη της επίδρασης ποικίλων παραγόντων στην απόδοση της αντίδρασης παραγωγής GOS, συμπεριλαμβανομένων:

- ✓ της συγκέντρωσης της λακτόζης
- ✓ της δραστικότητας του ενζύμου
- ✓ της τιμής pH του υποστρώματος
- ✓ της θερμοκρασίας πραγματοποίησης της ενζυμικής αντίδρασης
- ✓ της παρουσίας πρωτεϊνών και αλάτων στο υπόστρωμα
- ✓ της μικροβιακής προέλευσης του ενζύμου, μέσω της σύγκρισης των αποτελεσμάτων της παρούσας διπλωματικής εργασίας με προηγούμενες που έχουν διεξαχθεί στο εργαστήριο.

4.2 Υλικά-Αντιδραστήρια

Τα υλικά-αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν για την εκπόνηση της παρούσας διπλωματικής εργασίας παρουσιάζονται αναλυτικά παρακάτω.

Αντιδραστήρια

- Όξινος ορός γιαουρτιού περιεκτικότητας >0,1% κ.β. σε λιπαρά**.**
- H_2O υψηλού βαθμού καθαρότητας για αναλύσεις HPLC (Sigma-Aldrich, Γερμανία)
- Ακετονιτρίλιο υψηλού βαθμού καθαρότητας για αναλύσεις HPLC (Fisher Scientific, Γερμανία)
- Λακτόζη (Lactose hydrous $C_{12}H_{22}O_{11}\cdot H_2O$, Malinckrodt chemical works, ΗΠΑ)
- Γαλακτόζη (D(+)-Galactose extra pure, $C_6H_{12}O_6$, Art. 4061, Merck, Γερμανία)
- Γλυκόζη (D (+)-glucose anhydrous for bacteriology, HOCH2CH(CHOH)4O, Fluka-Garantie, Γερμανία)
- Ραφινόζη (D(+)-Raffinose Pentahydrat puriss.p.a., Fluka-Garantie, Γερμανία)
- Σταχυόζη (stachyose hydrate from Stachys tuberifa, Sigma analytica, USA)
- Ορθο-νιτροφαίνυλο-β-D-γαλακτοπυρανόζη (o-NPG) - (Sigma-Aldrich chemie GmbH, Γερμανία)
- Ορθο-νιτροφαινόλη (o-NP) - (Sigma-Aldrich chemie GmbH, Γερμανία)
- Μονοβασικό φωσφορικό νάτριο (Sodium phosphate monobasic monohydrate) – (Carlo erba reagents, Γαλλία)
- Διβασικό φωσφορικό νάτριο (Sodium phosphate dibasic monohydrate) – (Carlo erba reagents, Γαλλία)
- Υδροξείδιο του νατρίου (Sigma-Aldrich chemie GmbH, Γερμανία)
- Δωδεκακυλοθειϊκό νάτριο (Sodium Dodecyl Sulphate) - (SDS – PRS Panreac, Ισπανία)
- Tris(hydroxymethyl)aminomethane (Acros Organics, Βέλγιο)
- Γλυκίνη (Serva, Γερμανία)
- Γλυκερόλη (Lach ner, Γερμανία)
- 2-Μερκαπτοαιθανόλη (Mercaptoethanol - Serva, Γερμανία)
- Coomassie Brilliant blue G (Sigma-Aldrich chemie GmbH, Γερμανία)
- Μεθανόλη (Applichem Panreac, Γερμανία)
- Οξικό οξύ (Acetic Acid – Chembiotin, Βέλγιο)
- Οξικό νάτριο (Sodium Acetate-Chembiotin, Βέλγιο)

Ένζυμα

- Ένζυμο β-γαλακτοζιδάσης από τον μικροοργανισμό *K. lactis* (Biolactase L20, Kerry, Ιρλανδία), με ονομαστική ενζυμική δραστικότητα ≥ 20,000 GU/mL

4.3 Μέθοδοι

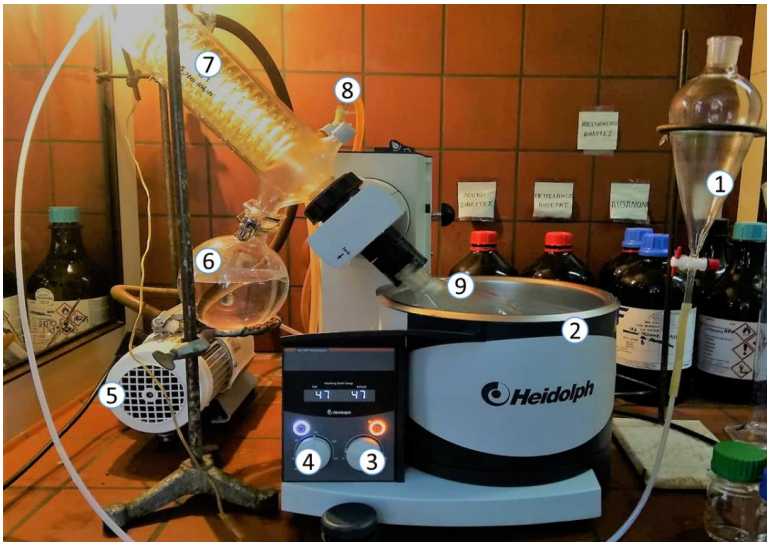
Οι μέθοδοι που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα διπλωματική εργασία είναι:

1. Συμπύκνωση υπό κενό για την επίτευξη της επιθυμητής περιεκτικότητας του ορού σε λακτόζη
2. Υπερδιήθηση του ορού για την απομάκρυνση των περιεχόμενων πρωτεϊνών

4.3.1 Παραλαβή του όξινου ορού και ρύθμιση της περιεκτικότητας της περιεχόμενης λακτόζης

Ο όξινος ορός που χρησιμοποιήθηκε για τα πειράματα της συγκεκριμένης διπλωματικής εργασίας προέρχεται από απόβλητα γιαουρτιού της Ελληνικής Βιομηχανίας ΔΕΛΤΑ ΤΡΟΦΙΜΑ Α.Ε. Μελετήθηκαν απόβλητα με τρεις διαφορετικές ημερομηνίες συλλογής (27/3/2018, 31/5/2018 και 31/10/2018), ώστε να ελεγχθεί πιθανή διαφοροποίηση της σύστασης του ορού σε λακτόζη και τυχόν αλλαγή στο pH.

Ο όξινος ορός που παραλήφθηκε μετατράπηκε, εφόσον αυτό ήταν επιθυμητό, μέσω του συστήματος συμπύκνωσης με εξάτμιση υπό κενό (Εικόνα 4.1, Rotary evaporators, Hel-VAP, Heidolph, Γερμανία) σε ένα υπόστρωμα υψηλής περιεκτικότητας σε λακτόζη. Συγκεκριμένα δημιουργήθηκαν δείγματα όξινου ορού περιεκτικότητας 9, 14 και 17% κ.ό. σε λακτόζη, ενώ παράλληλα χρησιμοποιήθηκε ο ανεπεξέργαστος ορός (3,5% κ.ό.) ως υπόστρωμα, στα πλαίσια μίας ολοκληρωμένης σύγκρισης.



Εικόνα 4.1. *Σύστημα συμπύκνωσης με εξάτμιση υπό κενό με αριθμημένα τα βασικότερα σημεία*

Τα αριθμημένα σημεία αναφέρονται σε:

1. Χοάνη που λειτουργεί ως συνεχής τροφοδοσία του δείγματος στο σύστημα

2. Λουτρό του οποίου η θερμοκρασία ρυθμίζεται κατάλληλα για την εξάτμιση του δείγματος, στο οποίο είναι τοποθετημένη η φιάλη συλλογής του συμπυκνώματος. Η φιάλη βρίσκεται υπό ανάδευση ώστε το δείγμα να βρίσκεται στην ίδια θερμοκρασία σε όλα τα σημεία του και να αποφεύγονται φαινόμενα βρασμού

3. Ρυθμιστής θερμοκρασίας λουτρού

4. Ρυθμιστής ανάδευσης της φιάλης συλλογής του συμπυκνώματος

5. Αντλία κενού

6. Φιάλη συλλογής ατμού

7. Ψυκτήρας τύπου Dimroth

8. Παροχή νερού

9. Φιάλη συλλογής συμπυκνώματος

Το σύστημα λειτουργεί υπό κενό, ώστε να μπορεί να γίνει η συμπύκνωση σε χαμηλές θερμοκρασίες και με μεγαλύτερη απόδοση. Το κενό δημιουργείται μέσω μιας αντλίας, η οποία είναι συνδεδεμένη με τον ψυκτήρα. Ο ψυκτήρας τύπου Dimroth διαθέτει μια στρόφιγγα, η οποία ανάλογα με τη θέση στην οποία βρίσκεται, επιτυγχάνεται ή όχι κενό. Ο ψυκτήρας επικοινωνεί μέσω σωλήνα με τη χοάνη, από όπου το δείγμα εισέρχεται στο σύστημα λόγω διαφοράς πίεσης, και καταλήγει στη φιάλη συλλογής του συμπυκνώματος.

Στην παρούσα εργασία, ο συμπυκνωτήρας εξάτμισης λειτουργούσε υπό κενό σε θερμοκρασία 52°C και με συνεχή ανάδευση στα 200 rpm. Η θερμοκρασία επιλέχθηκε με βάση την απόδοση της διεργασίας σε σχέση με το χρόνο, καθώς επιτυγχάνεται επιτάχυνση της διεργασίας με αύξηση της θερμοκρασίας, ενώ παράλληλα έπρεπε να διατηρούνται ήπιες συνθήκες συμπύκνωσης.

4.3.2 Απομάκρυνση των πρωτεϊνών

Προκειμένου να ελεγχθεί εάν η παρουσία πρωτεϊνών στον όξινο ορό επηρεάζει την ενζυμική μετατροπή της λακτόζης σε GOS, οι περιεχόμενες σε αυτόν πρωτεΐνες ορού απομακρύνθηκαν μέσω υπερδιήθησης. Η απομάκρυνση των πρωτεϊνών πραγματοποιήθηκε με υπερδιήθηση σε συσκευή Amino pellicon χωρητικότητας 300 mL (Εικόνα 4.2, M8400, Millipore, ΗΠΑ), όπου ο διαχωρισμός επιτυγχάνεται με χρήση μεμβράνης, η οποία διαχωρίζει, με βάση το μοριακό βάρος, τα περιεχόμενα συστατικά του προς επεξεργασία διαλύματος. Οι πρωτεΐνες που υπάρχουν στον όξινο ορό όπως είναι γνωστές βιβλιογραφικά περιλαμβάνουν μεταξύ άλλων την α-γαλακτοαλβουμίνη που εμφανίζει και το μικρότερο μέγεθος (14 kDa) και την β-γαλακτογλοβουλίνη (18 kDa), και έτσι επιλέχθηκε μεμβράνη με κατώτερο όριο διέλευσης μορίων τα 10 kDa.

Εικόνα 4.2. *Συσκευή υπερδιήθησης*

Η απομάκρυνση των πρωτεϊνών με το σύστημα Amino pellicon γίνεται σε πιέσεις που δεν ξεπερνούν τα 75 psi, ενώ για λόγους ασφαλείας επιλέχθηκε λειτουργία του συστήματος στα

60 psi. Το σύστημα καθαρίζεται με διάλυμα NaOH 0,1 N και οι μεμβράνες φυλάσσονταν σε δοχεία, εμβαπτισμένες σε οινόπνευμα στους 5°C, ενώ πριν την εισαγωγή του δείγματος γινόταν πλύση τους με απιονισμένο H_2O. Η επιβεβαίωση για την απουσία πρωτεϊνικού περιεχομένου στον τελικό ορό επιβεβαιώθηκε με Ηλεκτροφόρηση Πρωτεϊνών σε Αποδιατακτικές Συνθήκες σε Πήκτωμα Πολυακρυλαμίδης (Sodium Dodecyl Sulfate - Polyacrylamide Gel Electrophoresis, SDS-PAGE), όπως περιγράφεται στη συνέχεια. .

4.4 Πειραματική Διαδικασία

Κύρια πειραματική διαδικασία της παρούσας διπλωματικής εργασίας αποτελεί η ενζυμική μετατροπή της λακτόζης του όξινου ορού σε γαλακτοολιγοσακχαρίτες. Η αντίδραση πραγματοποιείται με το μικροβιακής προέλευσης ένζυμο της β-γαλακτοζιδάσης από *K. lactis*, το οποίο καταλύει τη διάσπαση του β-γλυκοζιτικού δεσμού της λακτόζης, ενώ υπό κατάλληλες συνθήκες δύναται να καταλύσει και τη δημιουργία του β-γλυκοζιτικού δεσμού, μέσω ανατιδράσεων τρανσγαλακτοζυλίωσης.

Πριν από την ενζυμική αντίδραση, εάν αυτό ήταν επιθυμητό πραγματοποιήθηκε συμπύκνωση του όξινου ορού σε προκαθορισμένα επίπεδα περιεκτικότητας σε λακτόζης, όπως αναφέρθηκε στην παράγραφο 6.3.1. παράλληλα, έγινε ρύθμιση της τιμής του pH του όξινου ορού με προσθήκη NaOH 4N στα επιθυμητά επίπεδα, όπως αυτά περιγράφονται στην παράγραφο 6.6. Η μέτρηση του pH πραγματοποιήθηκε με πεχάμετρο ακρίβειας τριών δεκαδικών ψηφίων (Εικόνα 4.3, AMEL 338, Amel Instrument, Ιταλία).

Εικόνα 4.3. *Πεχάμετρο ακρίβειας τριών δεκαδικών ψηφίων*

Η βασική πειραματική διαδικασία της ενζυμικής αντίδρασης περιλαμβάνει τα ακόλουθα στάδια:

1.Το ένζυμο της β-γαλακτοζιδάσης αραιώθηκε με ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών ιόντων τιμής pH 7. Για την παρασκευή του χρησιμοποιήθηκαν υδατικά διαλύματα μονοβασικού και διβασικού φωσφορικού νατρίου.

2. Ποσότητα όξινου ορού επιθυμητής περιεκτικότητας σε λακτόζη και επιθυμητού pH μεταφέρθηκε σε δοκιμαστικό σωλήνα. (Εικόνα 4.4-Α)

3. Οι δοκιμαστικοί σωλήνες τοποθετήθηκαν στο υδατόλουτρο επιθυμητής θερμοκρασίας και προστέθηκε ποσότητα ενζύμου επιθυμητής ενζυμικής ενεργότητας. (Εικόνα 4.4-Β)

4. Λήφθηκαν δείγματα σε προκαθορισμένα χρονικά διαστήματα, και ακολούθησε απενεργοποίηση του ενζύμου με βρασμό για 6 min. (Εικόνα 44-Γ)

5. Στη συνέχεια, τα δείγματα αποθηκεύτηκαν υπό κατάψυξη μέχρι να αναλυθούν.

Εικόνα 4.4. *Προετοιμασία δείγματος για την ενζυμική αντίδραση (Α), παραμονή των δειγμάτων στο υδατόλουτρο για επίτευξη της επιθυμητής θερμοκρασίας (Β) και βρασμός για την απενεργοποίηση του ενζύμου (Γ)*

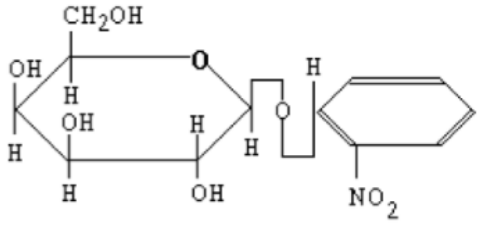
4.5 Αναλύσεις

Οι αναλύσεις που πραγματοποιήθηκαν στην παρούσα διπλωματική εργασία περιλαμβάνουν:

1. Μέτρηση της ενζυμικής ενεργότητας της β-γαλακτοζιδάσης
2. Μέθοδος προσδιορισμού των πρωτεϊνών με ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE
3. Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης (High Performance Liquid Chromatograpgy, HPLC),
4. Χρωματογραφία Ανιονεναλλαγής Υψηλής Απόδοσης με Παλμικό Αμπερομετρικό Ανιχνευτή (High Performance Anion-Exchange Chromatography - Pulsed Amperometric Detection, HPAEC-PAD)

4.5.1 Μέτρηση της ενζυμικής ενεργότητας της β-γαλακτοζιδάσης

Για την μέτρηση της ενεργότητας της β-γαλακτοζιδάσης χρησιμοποιήθηκε ως υπόστρωμα, αντί της λακτόζης, η ένωση ορθο-νιτροφαίνυλο-β-D-γαλακτοπυρανόζη (Εικόνα 4.5, oNPG). Η ένωση αυτή αποτελείται από ένα μόριο γαλακτόζης και ένα μόριο ορθο-νιτροφαινόλης ενωμένα με β-D-γαλακτοζιτικό δεσμό, τον οποίο η β-γαλακτοζιδάση αναγνωρίζει και υδρολύει. Ουσιαστικά, το μόριο της oNPG αποτελεί απομίμηση του μορίου της λακτόζης.



Εικόνα 4.5. *Μόριο ορθο-νιτροφαίνυλο-β-D-γαλακτοπυρανόζη (oNPG)*

Για τη β-γαλακτοζιδάση, ως 1 Unit ορίζεται το ποσό του ενζύμου που απελευθερώνει 1 μmol ορθο-νιτροφαινόλης ανά λεπτό, υπό συνθήκες περίσσειας υποστρώματος (oNPG), σε τιμή pH 7,0 και θερμοκρασία 37°C.

Έτσι, για τον προσδιορισμό της ενεργότητας του ενζύμου πραγματοποιήθηκαν τα παρακάτω βήματα:

1) Κατάλληλη αραίωση του ενζύμου σε ρυθμιστικό διάλυμα Na_2HPO_4/NaH_2PO_4 με pH=7.

2) Παρασκευή διαλυμάτων oNPG συγκέντρωσης 0,3 mM σε ρυθμιστικό διάλυμα Na_2HPO_4/NaH_2PO_4 με pH=7,0.

3) Σε δοκιμαστικούς σωλήνες τοποθετήθηκαν 2,5 mL διαλύματος oNPG και ακολούθησε προσθήκη 0,2 mL απιονισμένου νερού για το τυφλό δείγμα και 0,2 mL ενζύμου στους υπόλοιπους. Μετά από ανάδευση, οι δοκιμαστικοί σωλήνες τοποθετήθηκαν σε υδατόλουτρο θερμοκρασίας 37°C.

4) Μετά την πάροδο ακριβώς 10 min, οι σωλήνες μεταφέρθηκαν σε παγόλουτρο και σε καθέναν από αυτούς προστέθηκε 0,5 mL Na_2CO_3 30% w/v.

5) Πραγματοποιήθηκε φωτομέτρηση των δειγμάτων σε φασματοφωτόμετρο UV-Vis (Helios Unicam, Γερμανία) στα 410 nm.

Για τη μέτρηση της δραστικότητας του ενζύμου, με βάση τα παραπάνω κατασκευάστηκε η καμπύλη αναφοράς της oNPG, ώστε να μπορεί να υπολογιστεί η ποσότητα oNPG που απελευθερώνεται ανά λεπτό ενζυμικής αντίδρασης. Επειδή η oNPG πριν την διάσπασή της από τη β-γαλακτοζιδάση δεν απορροφά στο φασματοφωτόμετρο, στην καμπύλη αναφοράς χρησιμοποιήθηκε η ορθο-νιτροφαινόλη (oNP).

Η διαδικασία που ακολουθήθηκε για την κατασκευή της καμπύλης αναφοράς της oNP είναι μέσω παρασκευής πρότυπων διαλυμάτων oNP και μέτρησης της απορρόφησής τους στα 410 nm. Πιο αναλυτικά, παρασκευάστηκαν μητρικά διαλύματα oNP 0,30 g/L, τα οποία αραιώθηκαν με απιονισμένο νερό, έτσι ώστε να προκύψουν διαλύματα ορθο-νιτροφαινόλης τελικής συγκέντρωσης 0,05, 0,1, 0,15, 0,25 και 0,3 mM και τελικού όγκου 2 mL. Σε 2,5 mL ρυθμιστικού διαλύματος τιμής pH=7 προστέθηκαν 0,5 mL από κάθε διάλυμα ορθο-νιτροφαινόλης και τα τελικά διαλύματα ανακινήθηκαν επαρκώς. Τα δείγματα μετρήθηκαν σε φασματοφωτόμετρο στα 410 nm, χρησιμοποιώντας ως τυφλό δείγμα ρυθμιστικό διάλυμα τιμής pH=7.

4.5.2 Ηλεκτροφόρηση Πρωτεϊνών σε Αποδιατακτικές Συνθήκες σε Πήκτωμα Πολυακρυλαμίδης (Sodium Dodecyl Sulfate - Polyacrylamide Gel Electrophoresis, SDS-PAGE)

Για τον προσδιορισμό του βαθμού απομάκρυνσης των πρωτεϊνών μέσω της υπερδιήθησης με τη συσκευή Amicon, εφαρμόστηκε ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης του συμπυκνώματος που παραλήφθηκε κατά την υπερδιήθηση.

Το δείγμα αραιώθηκε 5 φορές σε ρυθμιστικό διάλυμα δωδεκακυλοθειϊκού νατρίου (2% SDS, 25 $g \cdot L^{-1}$ Tris pH = 6,8, glycerol, 2-Mercaptoethanol, 0,1% bromophenol blue). Ο διαχωρισμός των πρωτεϊνικών ζωνών πραγματοποιήθηκε με προκατασκευασμένο πήκτωμα 12% (Mini-PROTEAN TGX, BioRad Lab., US) χρησιμοποιώντας συσκευή ηλεκτροφόρησης Mini-PROTEAN (Εικόνα 4.6, Mini-PROTEAN TGX, BioRad Lab., US). Τα πηκτώματα λειτουργούσαν στα 35 mA και κατόπιν βάφτηκαν σε χρωστικό διάλυμα 4 $g \cdot L^{-1}$ Coomassie Brilliant Blue G (Coomassie Brilliant Blue G με διάλυμα 5:4:1 απιονισμένου νερού : μεθανόλης : οξικού οξέος) για 20 min. Ακολούθησε αποχρωματισμός του πηκτώματος με διάλυμα αποχρωματισμού (διάλυμα 5:4:1 απιονισμένου νερού:μεθανόλης:οξικού οξέος) έως ότου καθαρίσει το πήκτωμα και παραμείνουν χρωματισμένες μόνο οι πρωτεϊνικές ζώνες. Η

σχετική ένταση των χρωματισμένων πρωτεϊνικών ζωνών καθορίστηκε σαρώνοντας το πήκτωμα (HP Scanjet 4670, China).

Εικόνα 4.6. *Συσκευή ηλεκτροφόρησης Mini-PROTEAN TGX (BioRad Lab, USA)*

4.5.3 Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης (High Performance Liquid Chromatograpgy, HPLC)

Η υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης ανήκει στις χρωματογραφικές τεχνικές, άρα ο διαχωρισμός είναι αποτέλεσμα της συνδυαστικής δράσης μιας στατικής και μιας κινητής φάσης. Στην HPLC, το δείγμα εισάγεται στην είσοδο της στήλης και με τη βοήθεια της κινητής φάσης τα συστατικά του μετακινούνται με τη μορφή ζωνών και τελικά εκλούονται το ένα μετά το άλλο. Οι αναλυόμενες ουσίες κατανέμονται μεταξύ της στατικής και της κινητής φάσης, με αποτέλεσμα να μετακινούνται με διαφορετικές ταχύτητες κατά μήκος της στήλης.

Στην παρούσα διπλωματική εργασία, ο προσδιορισμός και η ποσοτικοποίηση των παραγόμενων GOS επιτεύχθηκε με ανάλυση των δειγμάτων σε σύστημα HPLC ((HPLC system Agilent series 1100, Γερμανία) με ανιχνευτή δείκτη διάθλασης (Refraction Index, RI, Hewlett Packard 1047A, Ιαπωνία), απαερωτή (degasser Hewlett Packard series 1200 G1379B, Ιαπωνία) και αντλία (iso pump G1310A Agilent series 1100, Γερμανία). Συγκεκριμένα, η στήλη που χρησιμοποιήθηκε ήταν η Microsorb-MV 100 NH_2 (Agilent Technologies, Γερμανία), συνοδευόμενη από όμοιου τύπου προ-στήλη Polaris 5 NH_2 MetaGuard (Agilent Technologies, Γερμανία).

Για την εξασφάλιση της ομαλής λειτουργίας της στήλης, όλα τα δείγματα πριν εισαχθούν στην HPLC φιλτράρονται με νάιλον φίλτρα πορώδους 0,22 μm. Ο ανιχνευτής δείκτη διάθλασης βασίζεται στη μέτρηση της διαφοράς του δείκτη διάθλασης μεταξύ της καθαρής κινητής φάσης και αυτής που περιέχει τα μελετώμενα σάκχαρα.

Η επιλογή της στήλης και της μεθόδου έγινε σύμφωνα με τους Fischer & Kleinschmidt (2015), κατά την οποία ως κινητή φάση χρησιμοποιείται ακετονιτρίλιο/νερό σε αναλογία 70:30, η ροή του διαλύτη ρυθμίζεται στα 1,3 mL/min και η ανάλυση πραγματοποιείται σε θερμοκρασία περιβάλλοντος.

4.5.4 Χρωματογραφία Ανιονεναλλαγής Υψηλής Απόδοσης με Παλμικό Αμπερομετρικό Ανιχνευτή (High Performance Anion-Exchange Chromatography - Pulsed Amperometric Detection, HPAEC-PAD)

Η Χρωματογραφία Ανιονεναλλαγής Υψηλής Απόδοσης με Παλμικό Αμπερομετρικό Ανιχνευτή αποτελεί μία βελτιωμένη χρωματογραφική τεχνική, που αναπτύχθηκε για να διαχωρίζει τους υδατάνθρακες. Σε συνδυασμό με τους παλμούς (PAD), επιτρέπει την άμεση ποσοτικοποίηση των μη-παραγοντοποιημένων υδατανθράκων σε πολύ χαμηλά επίπεδα συγκέντρωσης (της τάξεως των picomole) με ελάχιστη προετοιμασία και καθαρισμό του δείγματος. Η χρωματογραφία HPAEC εκμεταλλεύεται την ασθενώς όξινη φύση των

υδατανθράκων για να δώσει εξαιρετικά επιλεκτικό διαχωρισμό σε υψηλό pH, χρησιμοποιώντας ισχυρή ανταλλαγή ανιόντων στη στατική φάση.

Στην παρούσα διπλωματική εργασία χρησιμοποιήθηκε το παραπάνω σύστημα χρωματογραφίας με παλμικό αμπερομετρικό ανιχνευτή με ηλεκτρόδιο εργασίας χρυσού και ηλεκτρόδιο αναφοράς Ag/AgCl, και η στήλη που χρησιμοποιήθηκε ήταν η CarboPac PA1 Analytical (ThermoScientific, ΗΠΑ), συνοδευόμενη από όμοιου τύπου προ-στήλη CarboPac PA1 Guard (ThermoScientific, ΗΠΑ). Η κανονική πίεση λειτουργίας του συστήματος είναι 1400 psi, σε θερμοκρασία περιβάλλοντος.

Κατά την ανάλυση των δειγμάτων χρησιμοποιήθηκαν τρεις διαλύτες με το πρόγραμμα διαβάθμισης που παρουσιάζεται παρακάτω (Πίνακας 4.1). Οι διαλύτες που χρησιμοποιήθηκαν είναι A: 12,5 mM NaOH , B: 125 mM NaOH, και C: 125 mM NaOH/500mM CH_3COONa.

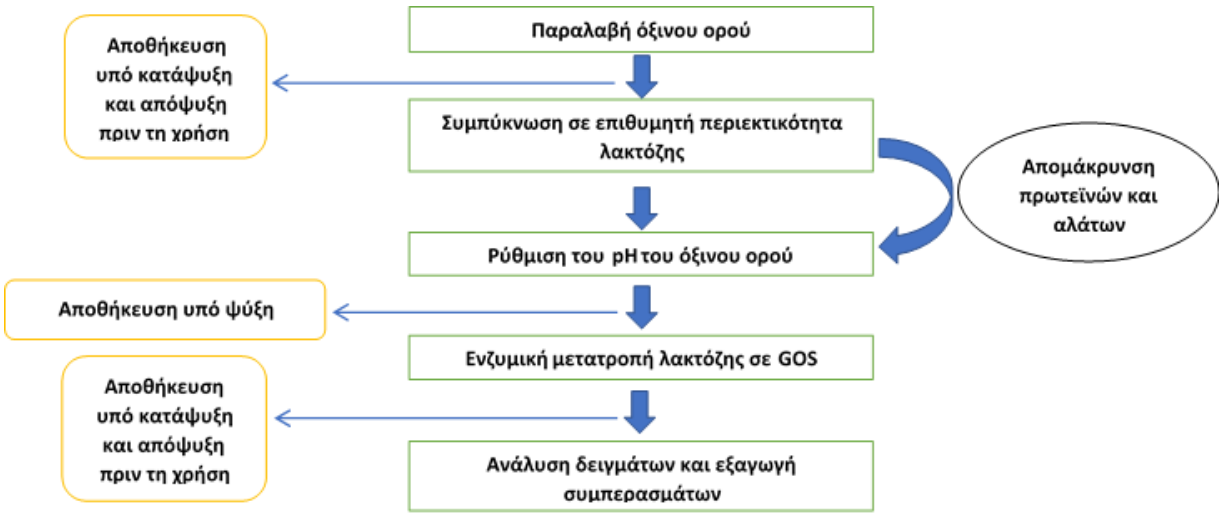
Πίνακας 4.1 *Πρόγραμμα διαβάθμισης διαλυτών του συστήματος HPAEC-PAD*

Χρόνος (min)	% A	% B	% C
0,0	95	5	0
20,1	95	5	0
35,0	0	100	0
55,0	0	100	0
55,1	0	0	100
65,0	0	0	100
65,1	95	5	0
80,0	95	5	0

4.6 Σχεδιασμός πειραμάτων

Προκειμένου να επιτευχθούν οι στόχοι της παρούσας διπλωματικής εργασίας, το πειραματικό μέρος της χωρίστηκε σε τέσσερεις (4) πειραματικές σειρές, καθεμία από τις οποίες αφορούσε στη μελέτη των διαφορετικών παραμέτρων που επηρεάζουν την ενζυμική μετατροπή της λακτόζης του όξινου ορού σε GOS.

Στην ακόλουθη εικόνα (Εικόνα 4.7) παρουσιάζονται τα στάδια που ακολουθήθηκαν με τις παραπάνω πειραματικές σειρές.



Εικόνα 4.7. *Διάγραμμα ροής πειραματικής διαδικασίας που ακολουθήθηκε στην παρούσα διπλωματική εργασία*

Με βάση το παραπάνω διάγραμμα ροής στην παρούσα εργασία μελετήθηκαν τα ακόλουθα:

- Η επίδραση της περιεκτικότητας σε λακτόζη του όξινου ορού και της ενζυμικής δραστικότητας στην απόδοση της ενζυμικής αντίδρασης για παραγωγή GOS, σε σταθερές συνθήκες θερμοκρασίας και pH και σε υπόστρωμα όξινου ορού που δεν είχε υποστεί οποιαδήποτε επεξεργασία (Πίνακας 4.2).

Πίνακας 4.2 *Πειραματικές συνθήκες για τη μελέτη της επίδρασης της περιεκτικότητας σε λακτόζη του όξινου ορού και της δραστικότητας του ενζύμου στο βαθμό απόδοσης σε GOS*

Συγκέντρωση υποστρώματος λακτόζης (% κ.ό.)	**Δραστικότητα ενζύμου (U/mL)**	**Θερμοκρασία αντίδρασης (ºC)**	**pH υποστρώματος**
3,5 9,0 11,0 17,0	0,013 0,026 0,052	37	7

- Είναι γνωστό από βιβλιογραφικά δεδομένα ότι η βέλτιστη τιμή pH για τη δράση της β-γαλακτοζιδάσης από *K. lactis* είναι στο 7 (Pal et al. 2009, Xavier et al. 2018). Έτσι, προκειμένου να μελετηθεί η επίδραση της τιμής του pH του υποστρώματος στην απόδοση της ενζυμικής αντίδρασης, χρησιμοποιήθηκαν υποστρώματα όξινου ορού διαφορετικής οξύτητας, σε σταθερές συνθήκες συγκέντρωσης λακτόζης, ενζυμικής δραστικότητας και θερμοκρασίας (Πίνακας 4.3).

Πίνακας 4.3 *Πειραματικές συνθήκες για τη μελέτη της επίδρασης του pH του υποστρώματος στο βαθμό απόδοσης σε GOS*

Συγκέντρωση υποστρώματος λακτόζης (% κ.ό.)	**Δραστικότητα ενζύμου (U/mL)**	**Θερμοκρασία αντίδρασης (ºC)**	**pH υποστρώματος**
3,5	0,026	37	4,0 5,5 7,0

- Προκειμένου να μελετηθεί η επίδραση της θερμοκρασίας της ενζυμικής αντίδρασης στην απόδοση της ενζυμικής αντίδρασης για την παραγωγή GOS, μελετήθηκαν τρεις διαφορετικές θερμοκρασίες, σε σταθερές συνθήκες συγκέντρωσης λακτόζης, ενζυμικής δραστικότητας και τιμής pH του υποστρώματος (Πίνακας 4.4).

Πίνακας 4.4 *Πειραματικές συνθήκες για τη μελέτη της επίδρασης της θερμοκρασίας της ενζυμικής αντίδρασης στο βαθμό απόδοσης σε GOS*

Συγκέντρωση υποστρώματος λακτόζης (% κ.ό.)	**Δραστικότητα ενζύμου (U/mL)**	**Θερμοκρασία αντίδρασης (ºC)**	**pH υποστρώματος**
14	0,052	37 45 55	7,0

- Από βιβλιογραφικά δεδομένα είναι γνωστό ότι τόσο οι πρωτεΐνες όσο και τα περιεχόμενα άλατα του όξινου ορού είναι πιθανόν να παρεμποδίζουν την ενζυμική μετατροπή της λακτόζης σε GOS. Για το λόγο αυτό, η επίδραση της παρουσίας των πρωτεϊνών μελετήθηκε χρησιμοποιώντας δείγμα όξινου ορού στο οποίο είχαν απομακρυνθεί οι πρωτεΐνες μέσω υπερδιήθησης. Παράλληλα, μελετήθηκε και η πορεία της μελετώμενης ενζυμικής αντίδρασης σε υπόστρωμα πρότυπης λακτόζης, προκειμένου να διαπιστωθεί η επίδραση και των περιεχόμενων στον όξινο ορό αλάτων στην πορεία της αντίδρασης. Όλα τα παραπάνω πειράματα πραγματοποιήθηκαν σε σταθερές συνθήκες συγκέντρωσης λακτόζης, ενζυμικής δραστικότητας, θερμοκρασίας και τιμής pH του υποστρώματος (pH=7).

Πίνακας 4.5 *Πειραματικές συνθήκες για τη μελέτη της επίδρασης των συστατικών του ορού στο βαθμό απόδοσης σε GOS*

Συγκέντρωση υποστρώματος λακτόζης (% κ.ό.)	**Δραστικότητα ενζύμου (U/mL)**	**Θερμοκρασία αντίδρασης (°C)**	**Συστατικά του υποστρώματος**
14	0,052	37	Ανεπεξέργαστος ορός Ορός χωρίς πρωτεΐνες Πρότυπο διάλυμα λακτόζης

4.7 Στατιστική επεξεργασία αποτελεσμάτων

Για την επίτευξη των στόχων της παρούσας διπλωματικής εργασίας τα πειράματα επαναληφθήκαν δύο φορές και κάθε ανάλυση δείγματος πραγματοποιήθηκε τρεις φορές (n=6).

Προκειμένου να μελετηθεί η σημαντικότητα της επίδρασης των σχεδιαστικών παραμέτρων στο μέγιστο βαθμό απόδοσης σε GOS, τα πειραματικά δεδομένα υποβλήθηκαν σε γραμμική παραμετρική ανάλυση διακύμανσης (Factorial ANOVA), με παράλληλη σύγκριση των μέσων όρων μέσω της δοκιμής Duncan (Duncan's means post hoc comparison test), προκειμένου να διαπιστωθούν οι στατιστικές διαφορές μεταξύ των δειγμάτων ανά είδος σχεδιαστικής παραμέτρου και για τα επιμέρους πειράματα που διεξήχθησαν. Όλες οι αναλύσεις πραγματοποιήθηκαν χρησιμοποιώντας ως στάθμη σημαντικότητας την τιμή α = 0,95 (p-value = 0,05). Όλες οι στατιστικές αναλύσεις πραγματοποιήθηκαν με τη βοήθεια του λογισμικού Stastistica 7 (StatSoft Inc., Tulsa, OK, USA).

Κεφάλαιο 5ο
Αποτελέσματα και συζήτηση

5.1 Πρωτογενείς μετρήσεις

5.1.1 Χρόνοι έκλουσης σακχάρων στο σύστημα HPLC-RI

Στον Πίνακα 7.1 παρουσιάζεται μια σειρά σακχάρων, συμπεριλαμβανομένων μονοσακχαριτών και ολιγοσακχαριτών με βαθμό πολυμερισμού από 2 έως 4, καθώς και μιγμάτων τους, και οι αντίστοιχοι χρόνοι έκλουσής τους (Γαλάνη, 2016). Όπως προκύπτει από τον πίνακα, με το διαλύτη και τη στήλη που χρησιμοποιήθηκαν στις αναλύσεις, τα σάκχαρα φαίνεται να εκλούονται ομαδοποιημένα ανάλογα με τον βαθμό πολυμερισμού τους. Για παράδειγμα, οι μονοσακχαρίτες γαλακτόζη και γλυκόζη, όταν υπάρχουν και οι δύο στο δείγμα εκλούονται στον ίδιο χρόνο, χωρίς να διαχωρίζονται μεταξύ τους.

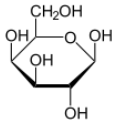
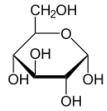
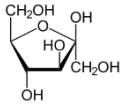
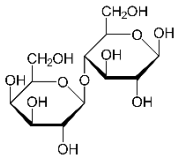
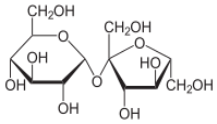
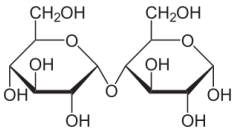
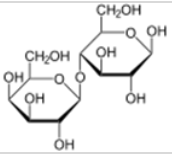
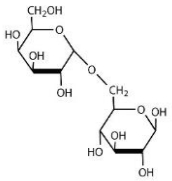
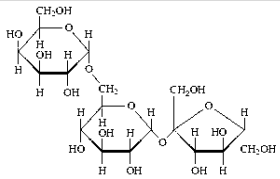
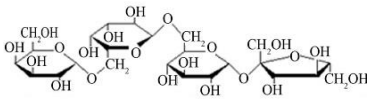
Αναφορικά με τους δισακχαρίτες παρατηρήθηκε ότι, στην περίπτωση ενώσεων που αποτελούνται από τα ίδια μονομερή σάκχαρα αυτοί συνεκλούονται, ενώ αντίθετα στην περίπτωση ενώσεων με διαφορετικά μονομερή σάκχαρα, εκλούονται σε διαφορετικούς χρόνους. Ακόμη, η αναγνώρισή τους έγινε αναφορικά με το χρόνο έκλουσης των μονοσακχαριτών.

Όπως φαίνεται και στον Πίνακα 7.1, ο χρόνος έκλουσης των μονοσακχαριτών ακολουθεί τη σειρά: φρουκτόζης < γλυκόζη < γαλακτόζη. Αυτό σημαίνει ότι οι ολιγοσακχαρίτες που περιέχουν φρουκτόζη εκλούνται προγενέστερα αυτών που περιέχουν γλυκόζη, κ.ο.κ. Έτσι, δεδομένου ότι ο τρισακχαρίτης της ραφινόζης έχει χρόνο έκλουσης περίπου στα 10 min και ο τετρασακχαρίτης της σταχυόζης στα 13 min, συμπεραίνεται ότι τα προϊόντα των ενζυμικών αντιδράσεων που μελετήθηκαν στην παρούσα διπλωματική εργασία είναι μίγματα GOS με βαθμό πολυμερισμού 2 ή 3, αφού εμφανίζουν χρόνο έκλουσης από τα 7,5 έως τα 11,0 min.

Επίσης, λόγω συνέκλουσης των μονοσακχαριτών όταν αυτοί βρίσκονται σε μίγματα αλλά και των σακχάρων με τον ίδιο βαθμό πολυμερισμού, οι μονοσακχαρίτες εκφράσθηκαν ως γαλακτόζη και οι δισακχαρίτες ως λακτόζη. Η επιλογή αυτή έγινε με βάση το γεγονός ότι στον ανεπεξέργαστο ορό ο μόνος μονοσακχαρίτης που υπάρχει είναι η γαλακτόζη και ο μόνος δισακχαρίτης που υπάρχει είναι η λακτόζη. Αυτό επιβεβαιώθηκε με την προσθήκη εσωτερικού προτύπου γαλακτόζης, αφού ο χρόνος έκλουσης δεν άλλαξε από αυτόν στην περίπτωση του δείγματος χωρίς το εσωτερικό πρότυπο. Τέλος, η συγκέντρωση των ολιγοσακχαριτών με βαθμό πολυμερισμού 2 ή 3 ποσοτικοποιήθηκαν χρησιμοποιώντας ως σάκχαρο αναφοράς τη ραφινόζη.

Οι παραπάνω αδυναμίες στην ταυτοποίηση σακχάρων με το σύστημα της HPLC δεν σχετίζεται με αστοχία στην επιλογή κατάλληλης στήλης, αφού η στήλη που επιλέχθηκε να χρησιμοποιηθεί είναι και η μόνη που προτείνεται, τόσο βιβλιογραφικά όσο και από τον προμηθευτή, για την ποσοτικοποίηση των μελετώμενων σακχάρων, αλλά σε συνολική αδυναμία της μεθόδου να διαχωρίσει πλήρως τα μελετώμενα σάκχαρα. Αυτός είναι άλλωστε και ο λόγος, που προτείνεται και εξετάστηκε η μέθοδος προσδιορισμού των εν λόγω σακχάρων με το σύστημα HPAEC-PAD, όπως θα αναλυθεί και στη συνέχεια.

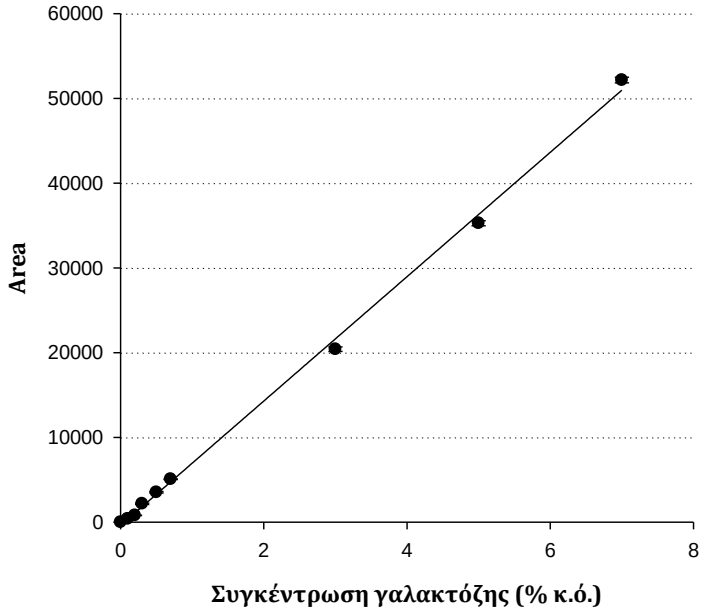
Πίνακας 5.1. *Σάκχαρα και χρόνοι έκλουσής τους στο σύστημα HPLC-RI με διαλύτη ACN:H2O σε αναλογία 70:30*

Ουσία	**Χρόνος έκλουσης (min)**	**Μοριακή Δομή**	**Συμβολισμός**
Γαλακτόζη (galactose)	**5,50**		α-Gal
Γλυκόζη (glucose)	5,17		α-Glc
Φρουκτόζη (fructose)	5,00		Fru
Λακτόζη (lactose)	**7,80**		Gal(β1→4)Glc
Σακχαρόζη (sucrose)	6,30		Glc(α1→2β)Fru
Μαλτόζη (maltose)	7,07		Glc(α1→4α)Glc
Τρεχαλόζη (trehalose)	7,45		Glc(α1→1α)Glc
Μελιβιόζη (melibiose)	7,15		Gal(α1→6)Glc
Ραφινόζη (raffinose)	9,78		Gal(α1→6α)Glc(α1→ 2β)Fru
Σταχυόζη (stachyose)	13,2		Gal(α1→6)Gal(α1→6) Glc(α1→2β)Fru
Λακτόζη+Μελιβιόζη	6,85	-	-
Γλυκόζη+Γαλακτόζη	5,20	-	-
Γλυκόζη+Γαλακτόζη +Φρουκτόζη	***4,86***	-	-

5.1.2 Καμπύλες αναφοράς γαλακτόζης, λακτόζης και ραφινόζης

5.1.2.1 Καμπύλη αναφοράς γαλακτόζης

Για τον ποσοτικό προσδιορισμό μέσω HPLC είναι απαραίτητη η κατασκευή καμπύλης αναφοράς της ουσίας που πρόκειται να μετρηθεί. Τα πρότυπα διαλύματα γαλακτόζης παρασκευάστηκαν σε περιεκτικότητες 0,1, 0,2, 0,3, 0,5, 0,7, 3,0, 5,0 και 7,0% κ.ό. Η καμπύλη αναφοράς του εμβαδού των κορυφών των χρωματογραφημάτων HPLC που αντιστοιχούν στη γαλακτόζη συναρτήσει της συγκέντρωσης γαλακτόζης παρουσιάζεται στο παρακάτω διάγραμμα.



Διάγραμμα 5.1. *Καμπύλη αναφοράς γαλακτόζης*

Η εξίσωση της καμπύλης αναφοράς της γαλακτόζης είναι:

$$\boldsymbol{Area = 7258{,}5 \cdot C_{\gamma\alpha\lambda\alpha\kappa\tau\acute{o}\zeta\eta\varsigma}}$$

όπου $C_{\gamma\alpha\lambda\alpha\kappa\tau\acute{o}\zeta\eta\varsigma}$ είναι η συγκέντρωση γαλακτόζης και αναφέρεται σε % κ.ό. Η εξίσωση εμφάνισε συντελεστή συσχέτισης (R^2) 0,9979.

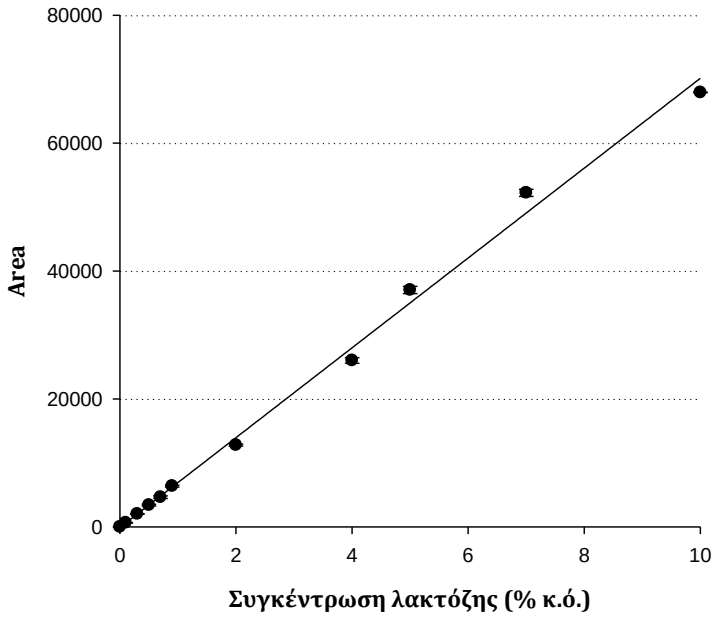
5.1.2.2 Καμπύλη αναφοράς λακτόζης

Τα πρότυπα διαλύματα λακτόζης παρασκευάστηκαν σε περιεκτικότητες 0,1, 0,3, 0,5, 0,7, 0,9, 2,0, 4,0, 5,0, 7,0 και 10,0% κ.ό. Η καμπύλη αναφοράς του εμβαδού των κορυφών των χρωματογραφημάτων HPLC που αντιστοιχούν στη λακτόζη συναρτήσει της συγκέντρωσης γαλακτόζης παρουσιάζεται στο Διάγραμμα 5.2.

Η εξίσωση της καμπύλης αναφοράς της λακτόζης είναι:

$$\boldsymbol{Area = 7007{,}9 \cdot C_{\lambda\alpha\kappa\tau\acute{o}\zeta\eta\varsigma}}$$

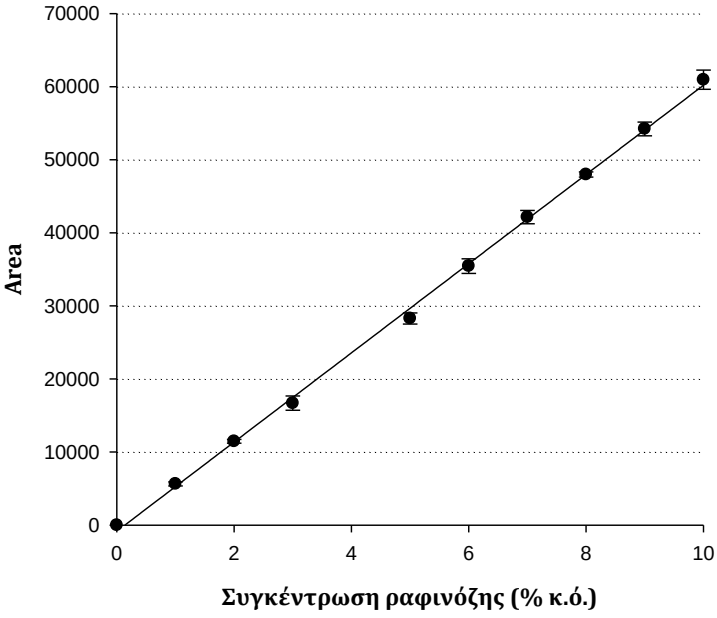
όπου $C_{\lambda\alpha\kappa\tau\acute{o}\zeta\eta\varsigma}$ είναι η συγκέντρωση λακτόζης και αναφέρεται σε % κ.ό. Η εξίσωση εμφάνισε συντελεστή συσχέτισης (R^2) 0,9952.



Διάγραμμα 5.2. *Καμπύλη αναφοράς λακτόζης*

5.1.2.3 Καμπύλη αναφοράς ραφινόζης

Τα πρότυπα διαλύματα ραφινόζης παρασκευάστηκαν σε περιεκτικότητες 1,0, 2,0, 3,0, 5,0, 6,0, 7,0, 8,0, 9,0 και 10,0% κ.ό. Η καμπύλη αναφοράς του εμβαδού των κορυφών των χρωματογραφημάτων HPLC που αντιστοιχούν στη ραφινόζη συναρτήσει της συγκέντρωσης ραφινόζης παρουσιάζεται στο παρακάτω διάγραμμα.



Διάγραμμα 5.3. *Καμπύλη αναφοράς ραφινόζης*

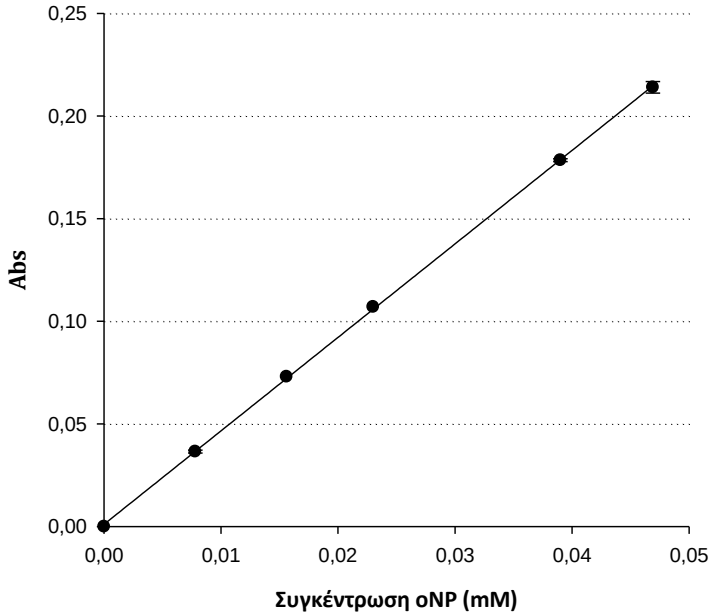
Η εξίσωση της καμπύλης αναφοράς της ραφινόζης είναι:

$$\boldsymbol{Area = 5986{,}6 \cdot C_{ραφινόζης}}$$

όπου, η $C_{ραφινόζης}$ είναι η συγκέντρωση ραφινόζης και αναφέρεται σε % κ.ο. Η εξίσωση εμφάνισε συντελεστή συσχέτισης (R^2) 0,9978.

5.1.2.4 Μέτρηση της ενζυμικής ενεργότητας της β-γαλακτοζιδάσης από το μικροοργανισμό *K. lactis*

Όπως αναφέρθηκε στο προηγούμενο κεφάλαιο (παράγραφος 4.8.1), για τον υπολογισμό της ενεργότητας της β-γαλακτοζιδάσης είναι απαραίτητη η κατασκευή της καμπύλης αναφοράς της ενεργότητας, χρησιμοποιώντας την ορθο-νιτροφαινόλης (Διάγραμμα 5.4).



Διάγραμμα 5.4. *Καμπύλη αναφοράς oNPG*

Όπως φαίνεται η απορρόφηση στα 410 nm σχετίζεται με τη συγκέντρωση της ορθο-νιτροφαινόλης μέσω της σχέσης:

$$C_{oNPG} = 0{,}2181 \cdot Abs$$

Όπου, Abs η μετρούμενη απορρόφηση και η C_{oNPG} η συγκέντρωση της ορθο-νιτροφαινόλης σε mM. Η εξίσωση εμφάνισε συντελεστή συσχέτισης (R^2) 0,9997.

Από τον ορισμό για τη δραστικότητα της β-γαλακτοζιδάσης, ως 1 Unit ορίζεται το ποσό του ενζύμου που απελευθερώνει 1 μmol ορθο-νιτροφαινόλης ανά λεπτό, υπό συνθήκες περίσσειας υποστρώματος, σε pH=6,5 και θερμοκρασία 37°C. Με βάση, επομένως, τα παραπάνω υπολογίστηκε η ενζυμική ενεργότητα της χρησιμοποιούμενης β-γαλακτοζιδάσης και βρέθηκε ίση προς 13,15 (±0,57) Units/mL.

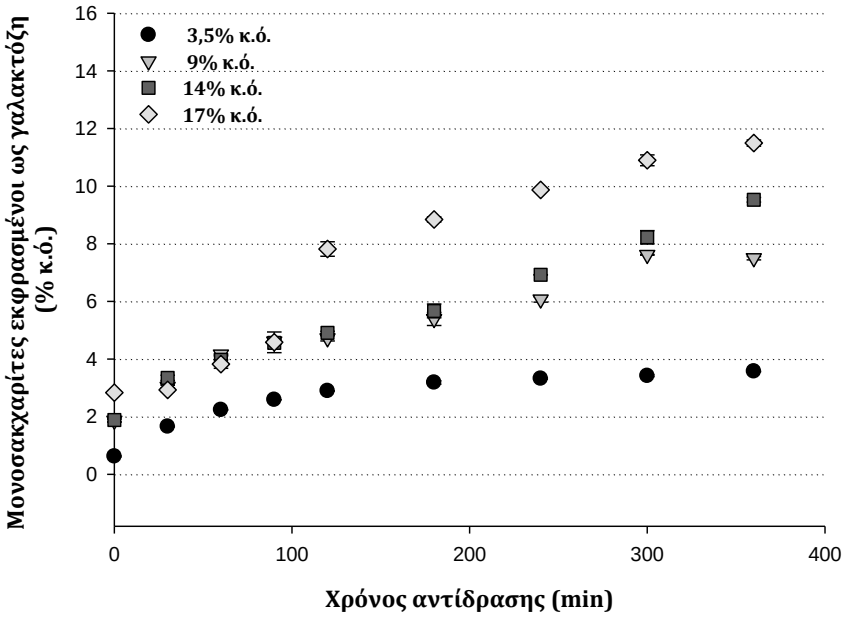
5.2 Αποτελέσματα ενζυμικών αντιδράσεων

5.2.1 Επίδραση της συγκέντρωσης της λακτόζης στην ενζυμική διεργασία μετατροπής της λακτόζης του όξινου ορού σε GOS

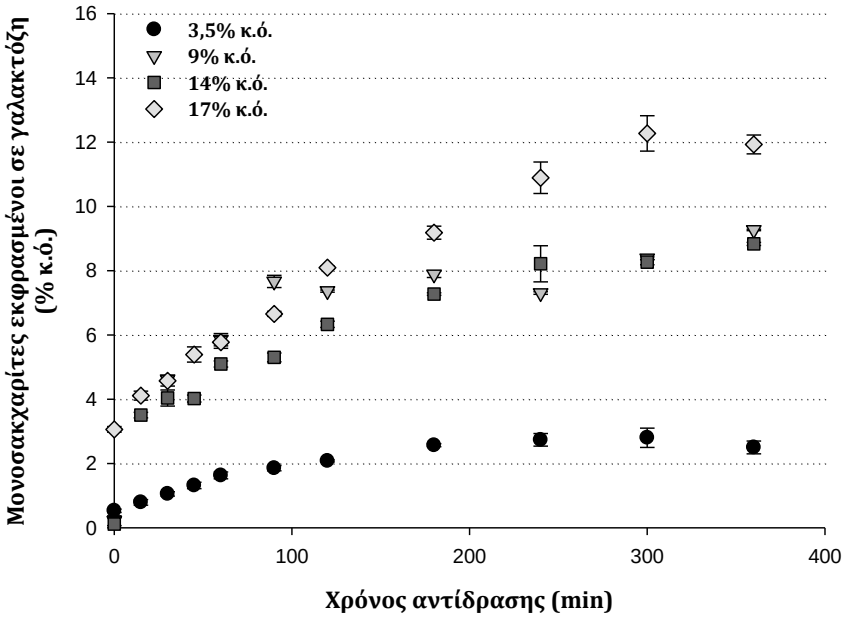
Ο πρώτος παράγοντας που μελετήθηκε είναι η επίδραση της συγκέντρωσης της λακτόζης στην ενζυμική διεργασία μετατροπής της λακτόζης του όξινου ορού σε GOS, όπως αναφέρθηκε και στην παράγραφο 4.6. Στα παρακάτω διαγράμματα (5.5-5.13) παρουσιάζεται η μεταβολή της συγκέντρωσης των μονοσακχαριτών εκφρασμένων ως γαλακτόζη και των δισακχαριστών εκφρασμένων ως λακτόζη, καθώς ο βαθμός απόδοσης σε GOS, συναρτήσει του χρόνου της ενζυμικής αντίδρασης, για κάθε περιεκτικότητα του υποστρώματος (ορού) σε

λακτόζη, για τις διάφορες ενεργότητες β-γαλακτοζιδάσης που μελετήθηκαν (0,013, 0,026 και 0,052 U/mL). Όλες οι ενζυμικές αντιδράσεις πραγματοποιήθηκαν σε θερμοκρασία 37ºC και τιμή pH 7,0. Ως βαθμός απόδοσης σε GOS ορίσθηκε το κλάσμα της συγκέντρωσης ολιγοσακχαριτών προς την αρχική συγκέντρωση λακτόζης στο αντιδρών μίγμα, σε κάθε χρονική στιγμή.

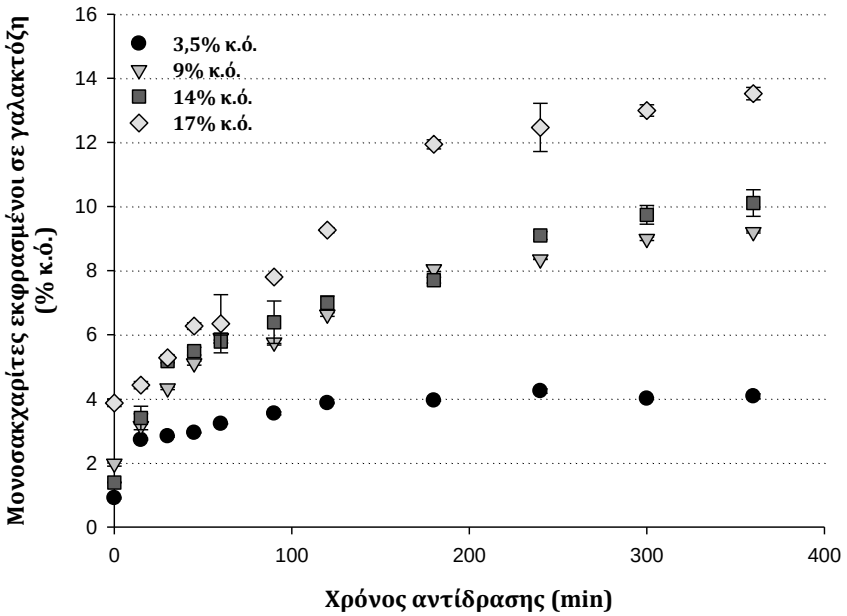
Στα Διαγράμματα 5.5, 5.6 και 5.7 παρουσιάζεται η μεταβολή των μονοσακχαριτών στο αντιδρών μίγμα συναρτήσει του χρόνου, για ενεργότητες ενζύμου 0,013, 0,026 και 0,052 U/mL, αντίστοιχα.



Διάγραμμα 5.5. *Μεταβολή μονοσακχαριτών εκφρασμένων ως γαλακτόζη σαν συνάρτηση του χρόνου αντίδρασης για ενζυμική ενεργότητα 0,013 U/mL*



Διάγραμμα 5.6. *Μεταβολή μονοσακχαριτών εκφρασμένων ως γαλακτόζη σαν συνάρτηση του χρόνου αντίδρασης για ενζυμική ενεργότητα 0,026 U/mL*

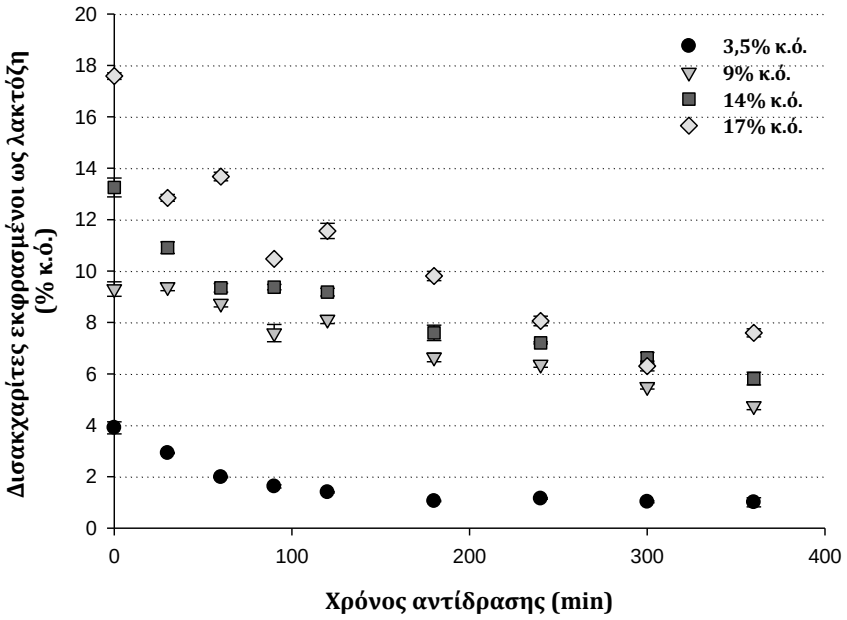


Διάγραμμα 5.7. *Μεταβολή μονοσακχαριτών εκφρασμένων ως γαλακτόζη σαν συνάρτηση του χρόνου αντίδρασης για ενζυμική ενεργότητα 0,052 U/mL*

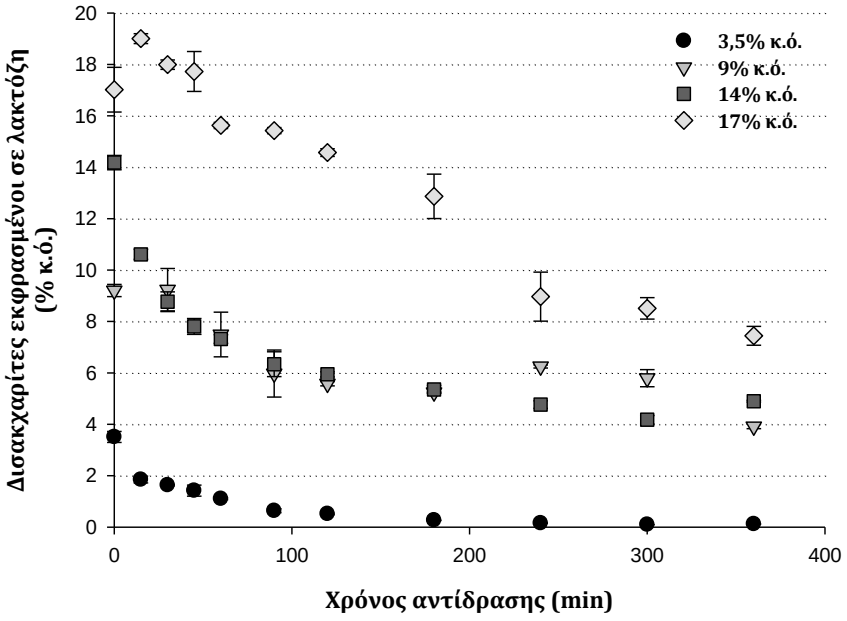
Από τα παραπάνω διαγράμματα παρατηρείται ότι οι μονοσακχαρίτες αυξάνονται με την πάροδο του χρόνου. Από τα χρωματογραφήματα του συστήματος HPLC παρατηρήθηκε ότι η κορυφή που αντιστοιχεί στους μονοσακχαρίτες δεν είναι καθαρή (πολλαπλές κορυφές που δεν διαχωρίζονται), γεγονός που υποδηλώνει την παραγωγή γλυκόζης, η οποία παράγεται λόγω της διάσπασης της λακτόζης στα μονομερή της. Ακόμη, παρατηρείται ότι σε υπόστρωμα λακτόζης 3,5% κ.ό. οι μονοσακχαρίτες παραμένουν σχεδόν σταθεροί μετά από χρονικό διάστημα περίπου 120 min. Το γεγονός αυτό οφείλεται στην πλήρη κατανάλωση της λακτόζης του υποστρώματος, όπως φαίνεται και από τα διαγράμματα μεταβολής των δισακχαριτών εκφρασμένων ως λακτόζης παρακάτω, με αποτέλεσμα τον τερματισμό της ενζυμικής αντίδρασης. Τέλος, παρατηρείται ότι η αύξηση των μονοσακχαριτών δεν επηρεάζεται από την ενεργότητα του χρησιμοποιούμενου ενζύμου, αλλά αυξάνεται αναλογικά με την αρχική περιεκτικότητα του υποστρώματος σε λακτόζη, καθώς αυξημένη συγκέντρωση λακτόζης οδηγεί σε αυξημένη συγκέντρωση προϊόντων υδρόλυσης (μονοσακχαρίτες).

Στα Διαγράμματα 5.8, 5.9 και 5.10 παρουσιάζεται η μεταβολή των δισακχαριτών στο αντιδρών μίγμα συναρτήσει του χρόνου, για ενεργότητες ενζύμου 0,013, 0,026 και 0,052U/mL, αντίστοιχα.

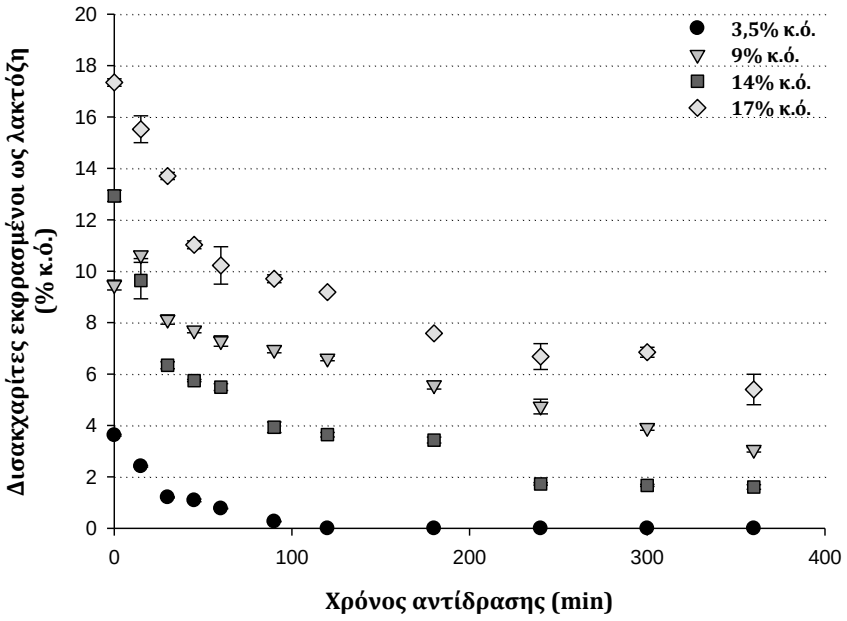
Στην έναρξη της αντίδρασης, ο μόνος δισακχαρίτης που υπάρχει στο αντιδρών σύστημα είναι η λακτόζη. Με την πάροδο του χρόνου η β-γαλακτοζιδάση εκτός της υδρόλυσης της λακτόζης, που θα σήμαινε και πτώση της συγκέντρωσης των δισακχαριτών στο σύστημα, καταλύει και την αντίδραση σχηματισμού τόσο δι- όσο και ολιγοσακχαριτών, με αποτέλεσμα η συνολική συγκέντρωση των δισακχαριτών να αυξάνεται λόγω της ύπαρξης στο σύστημα και νέων δισακχαριτών, όπως π.χ. γαλακτοβιόζης (Gal-Gal) ή/και αλλολακτόζης (Gal-Glc). Παράλληλα, η πτωτική τάση που παρουσιάζει η συγκέντρωση των συνολικών δισακχαριτών μπορεί να ερμηνευτεί και λόγω της περαιτέρω υδρόλυσης των νεοσχηματιζόμενων δισακχαριτών.



Διάγραμμα 5.8. *Μεταβολή δισακχαριτών εκφρασμένων ως λακτόζη σαν συνάρτηση του χρόνου αντίδρασης για ενζυμική ενεργότητα 0,013 U/mL*



Διάγραμμα 5.9. *Μεταβολή δισακχαριτών εκφρασμένων ως λακτόζη σαν συνάρτηση του χρόνου αντίδρασης για ενζυμική ενεργότητα 0,026 U/mL*



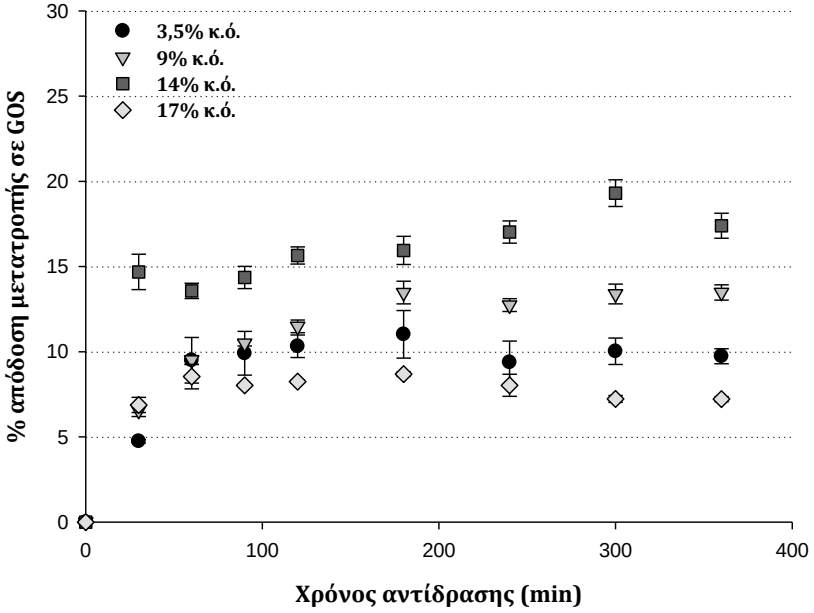
Διάγραμμα 5.10. *Μεταβολή δισακχαριτών εκφρασμένων ως λακτόζη σαν συνάρτηση του χρόνου αντίδρασης για ενζυμική ενεργότητα 0,052 U/mL*

Όπως παρατηρείται στα παραπάνω διαγράμματα, και επιβεβαιώνοντας τις προηγούμενες αναφορές, παρατηρείται μείωση της συνολικής συγκέντρωσης των δισακχαριτών, υποδηλώνοντας τόσο την κατανάλωση της λακτόζης του υποστρώματος όσο και την υδρόλυση των σχηματιζόμενων δισακχαριτών, φαινόμενα τα οποία φαίνεται να ενισχύονται όσο αυξάνεται η ενεργότητα του χρησιμοποιούμενου ενζύμου. Ειδικά, στην περίπτωση όπου χρησιμοποιήθηκε υπόστρωμα ορού 3,5% κ.ό. συγκέντρωσης λακτόζης, οι συνολικοί δισακχαρίτες έλαβαν μηδενική τελική τιμή για ενζυμικές ενεργότητες μεγαλύτερες από 0,026 U/mL και χρόνους αντίδρασης μικρότερους όσο αυξανόταν η ενζυμική ενεργότητα.

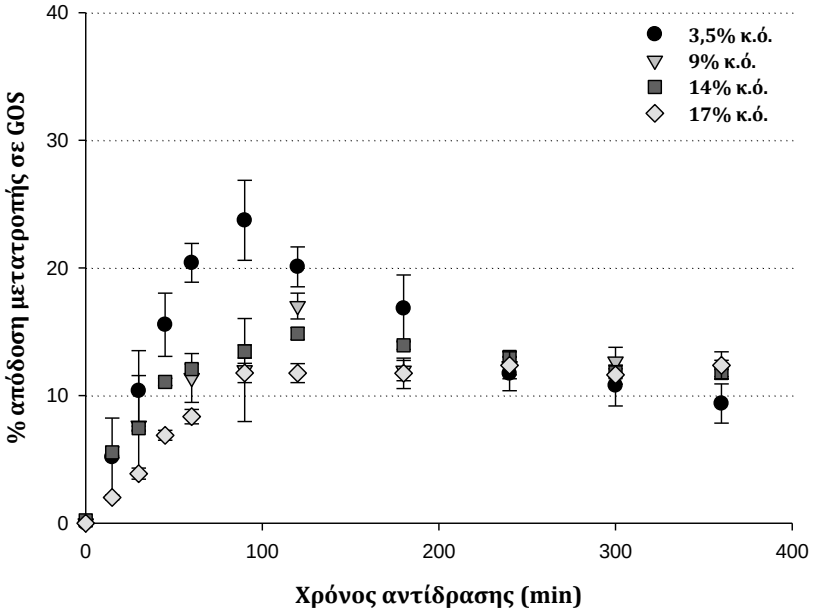
Τέλος, στα Διαγράμματα 5.11, 5.12 και 5.13 παρουσιάζεται ο βαθμός απόδοσης σε GOS στο αντιδρών μίγμα συναρτήσει του χρόνου, για ενεργότητες ενζύμου 0,013, 0,026 και 0,052 U/mL, αντίστοιχα.

Από τα διαγράμματα παρατηρείται ότι ο βαθμός απόδοσης σε GOS δεν μεταβάλλεται αναλογικά με την μεταβολή της συγκέντρωσης του υποστρώματος σε λακτόζη, για κάθε τιμή ενεργότητας ενζύμου. Για τιμή ενζυμικής ενεργότητας ίση με 0,013 και 0,052 U/mL η μέγιστη απόδοση της μετατροπής της λακτόζης σε GOS φαίνεται να αυξάνεται όσο αυξάνεται η περιεκτικότητα του υποστρώματος σε λακτόζη, για αρχική συγκέντρωση λακτόζης στον ορό μικρότερη ή ίση του 14% κ.ό. Σε υπόστρωμα με συγκέντρωση λακτόζης 17% κ.ό., ο μέγιστος βαθμός απόδοσης σε GOS μειώνεται, έχοντας παρόμοια τιμή με εκείνη της περίπτωσης του υποστρώματος περιεκτικότητας 9% κ.ό. σε λακτόζη, το οποίο δεν ήταν αναμενόμενο. Από την άλλη, για τιμή ενεργότητας ενζύμου ίση με 0,026 U/mL παρατηρήθηκε ότι με την αύξηση της περιεκτικότητας υποστρώματος σε λακτόζη ο μέγιστος βαθμός απόδοσης σε GOS μειώνεται.

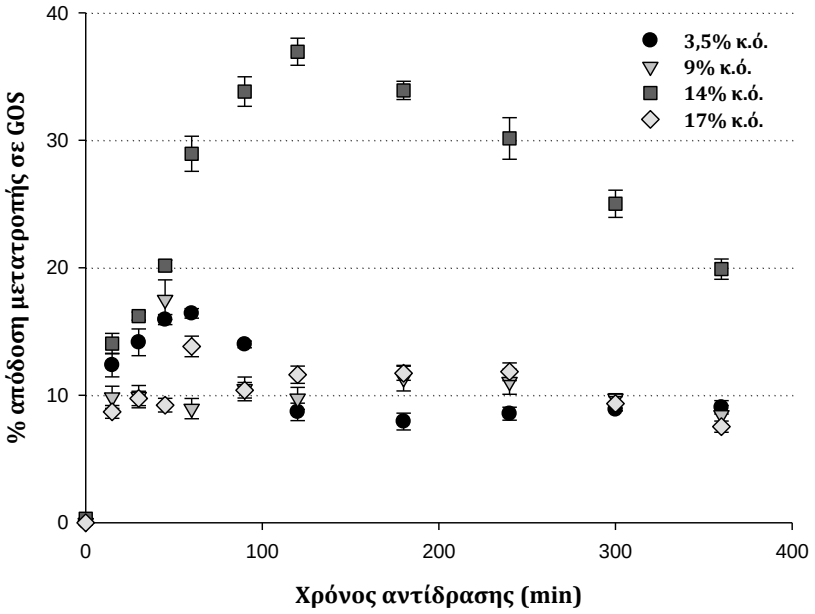
Σε γενικές γραμμές, ο βαθμός απόδοσης σε GOS αυξάνεται με αύξηση του χρόνου της αντίδρασης, εμφανίζοντας μέγιστο σε κάποια χρονική στιγμή, και κατόπιν μειώνεται, πιθανόν λόγω της περαιτέρω υδρόλυσης των παραγόμενων GOS από το ένζυμο. Εξαίρεση αποτελεί η περίπτωση της ενζυμικής αντίδρασης σε υπόστρωμα ορού 3,5% κ.ό. σε λακτόζη και με χρήση ενζύμου ενεργότητας 0,013 U/mL, όπου δεν παρατηρήθηκε οποιαδήποτε μείωση του βαθμού απόδοσης σε GOS μέχρι και τον τελικό χρόνο ελέγχου, δηλαδή τα 360 min.



Διάγραμμα 5.11. *Μεταβολή της απόδοσης μετατροπής σε GOS εκφρασμένων ως ραφινόζη σαν συνάρτηση του χρόνου αντίδρασης για ενζυμική ενεργότητα 0,013 U/mL*



Διάγραμμα 5.12. *Μεταβολή της απόδοσης μετατροπής σε GOS εκφρασμένων ως ραφινόζη σαν συνάρτηση του χρόνου αντίδρασης για ενζυμική ενεργότητα 0,026 U/mL*



Διάγραμμα 5.13. *Μεταβολή της απόδοσης μετατροπής σε GOS εκφρασμένων ως ραφινόζη σαν συνάρτηση του χρόνου αντίδρασης για ενζυμική ενεργότητα 0,052 U/mL*

Στον πίνακα που ακολουθεί παρουσιάζονται συνοπτικά τα μέγιστα των βαθμών απόδοσης σε GOS που επιτυγχάνονται για κάθε μία από τις χρησιμοποιούμενες ενζυμικές ενεργότητες και για κάθε συγκέντρωση λακτόζης στο υπόστρωμα της ενζυμικής αντίδρασης.

Πίνακας 5.2. *Μέγιστοι βαθμοί απόδοσης σε GOS συναρτήσει της συγκέντρωσης λακτόζης του υποστρώματος και της δραστικότητας του ενζύμου, σε τιμή pH 7,0 και θερμοκρασία αντίδρασης 37°C*

Συγκέντρωση λακτόζης στο υπόστρωμα (% κ.ό.)	**Ενεργότητα ενζύμου (U/mL)**	**Μέγιστη % απόδοση σε GOS***	**Χρόνος επίτευξης μέγιστης απόδοσης σε GOS (min)**
3,5	0,013	$12,8^{bc} \pm 1,28$	90
	0,026	$23,7^{f} \pm 3,05$	90
	0,052	$16,4^{de} \pm 0,37$	60
9	0,013	$13,5^{bc} \pm 0,45$	180
	0,026	$17,0^{de} \pm 1,01$	120
	0,052	$17,5^{e} \pm 1,55$	45
14	0,013	$19,3^{f} \pm 0,78$	300
	0,026	$14,9^{cd} \pm 0,47$	120
	0,052	$37,0^{g} \pm 1,06$	120
17	0,013	$8,68^{a} \pm 0,13$	180
	0,026	$11,8^{b} \pm 0,76$	90
	0,052	$13,8^{bc} \pm 0,81$	60

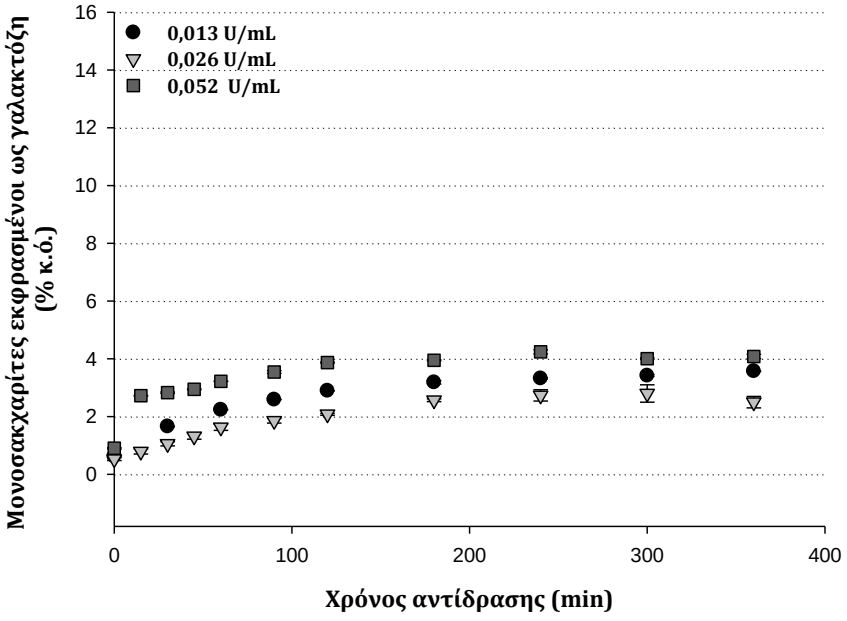
*Οι τιμές είναι οι μέσοι όροι ± τυπική απόκλιση τριών μετρήσεων και δύο πειραματικών σειρών (n=6).
Τα διαφορετικά γράμματα μεταξύ των γραμμών δείχνουν στατιστικά σημαντική διαφορά ($p<0,05$) μεταξύ των εξεταζόμενων δειγμάτων με βάση τη δοκιμή σύγκρισης μέσων όρων του Duncan (Duncan's mean values post hoc comparison test).

5.2.2 Επίδραση της ενεργότητας της β-γαλακτοζιδάσης στην ενζυμική διεργασία μετατροπής της λακτόζης του όξινου ορού σε GOS

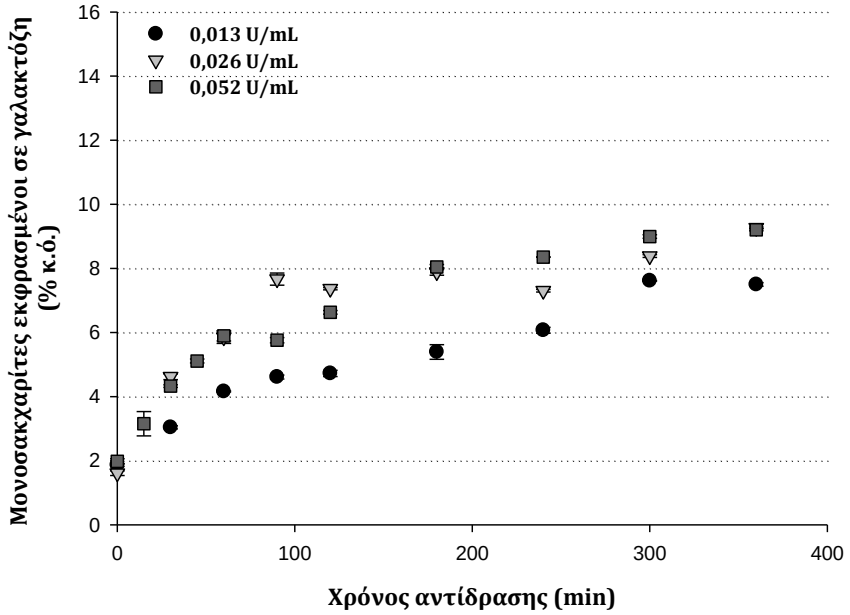
Ταυτόχρονα μελετήθηκε η επίδραση της ενεργότητας του ενζύμου στην ενζυμική διεργασία μετατροπής της λακτόζης του όξινου ορού σε GOS. Για κάθε μία από τις ενζυμικές αντιδράσεις που πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας ως υπόστρωμα όξινο ορό διαφορετικής περιεκτικότητας σε λακτόζη, αποτυπώθηκαν τα διαγράμματα της συγκέντρωσης μονοσακχαριτών και δισακχαριτών, καθώς και του βαθμού απόδοσης σε GOS συναρτήσει του χρόνου αντίδρασης για κάθε τιμή ενεργότητας ενζύμου (0,013, 0,026 και 0,052 U/mL), με σκοπό να μελετηθεί η επίδραση της ενεργότητας της β-γαλακτοζιδάσης στην απόδοση της αντίδρασης. Όλες οι ενζυμικές αντιδράσεις πραγματοποιήθηκαν σε θερμοκρασία 37ºC και τιμή pH υποστρώματος 7,0.

Αρχικά παρουσιάζονται τα διαγράμματα της μεταβολής των μονοσακχαριτών συναρτήσει του χρόνου στο αντιδρών μίγμα, για υπόστρωμα όξινου ορού με περιεκτικότητα σε λακτόζη 3,5%, 9%, 14%. και 17% κ.ό. (Διαγράμματα 5.14, 5.15, 5.16 και 5.17, αντίστοιχα).

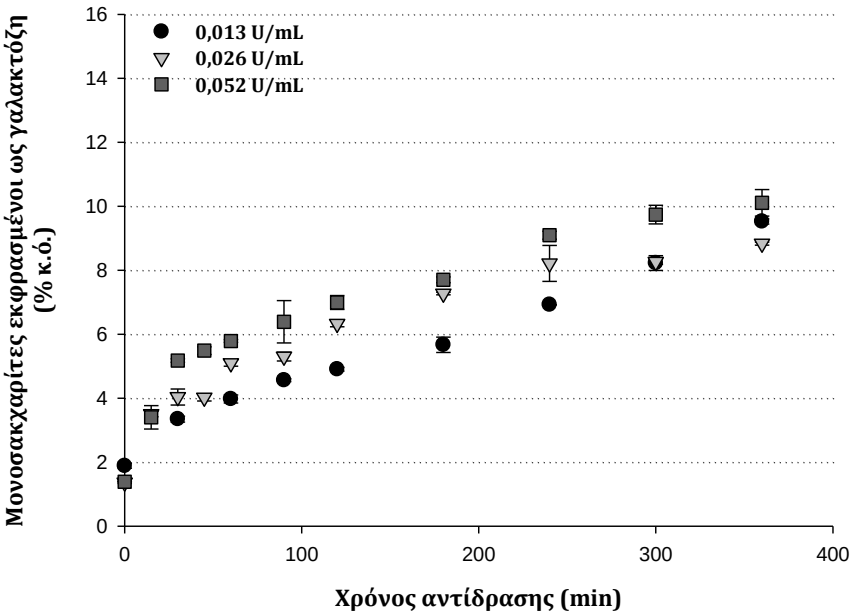
Όσον αφορά στην μεταβολή της συγκέντρωσης των μονοσακχαριτών στο αντιδρών μίγμα, παρατηρείται αύξηση αυτής, υποδηλώνοντας ότι σε κάθε περίπτωση υπάρχει παραγωγή μονοσακχαριτών που αυξάνεται γενικά με την πάροδο του χρόνου, ως αποτέλεσμα της υδρόλυσης της λακτόζης του ορού, και των παραγόμενων δι- και ολιγοσακχαριτών.



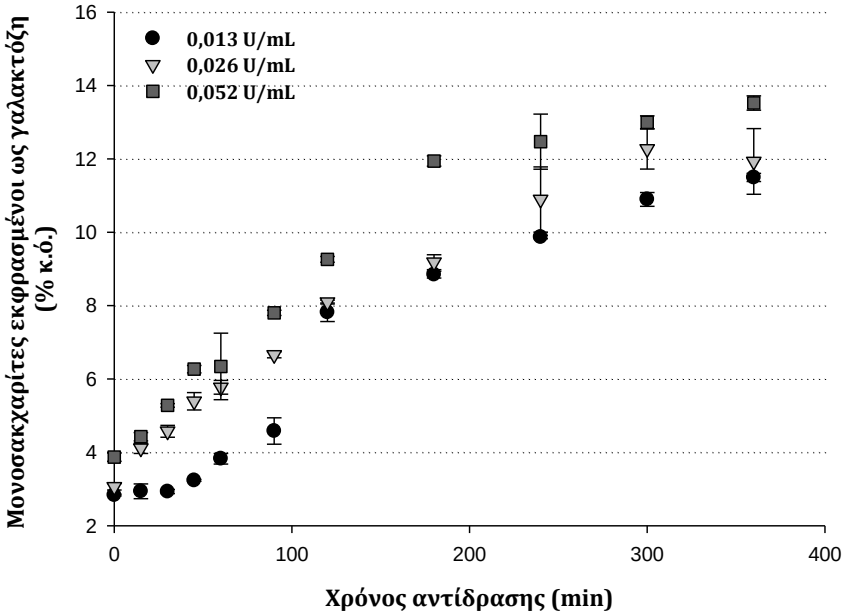
Διάγραμμα 5.14. *Μεταβολή μονοσακχαριτών εκφρασμένων ως γαλακτόζη σαν συνάρτηση του χρόνου αντίδρασης για συγκέντρωση υποστρώματος λακτόζης 3,5% κ.ό.*



Διάγραμμα 5.15. *Μεταβολή μονοσακχαριτών εκφρασμένων ως γαλακτόζη σαν συνάρτηση του χρόνου αντίδρασης για συγκέντρωση υποστρώματος λακτόζης 9,0% κ.ό.*

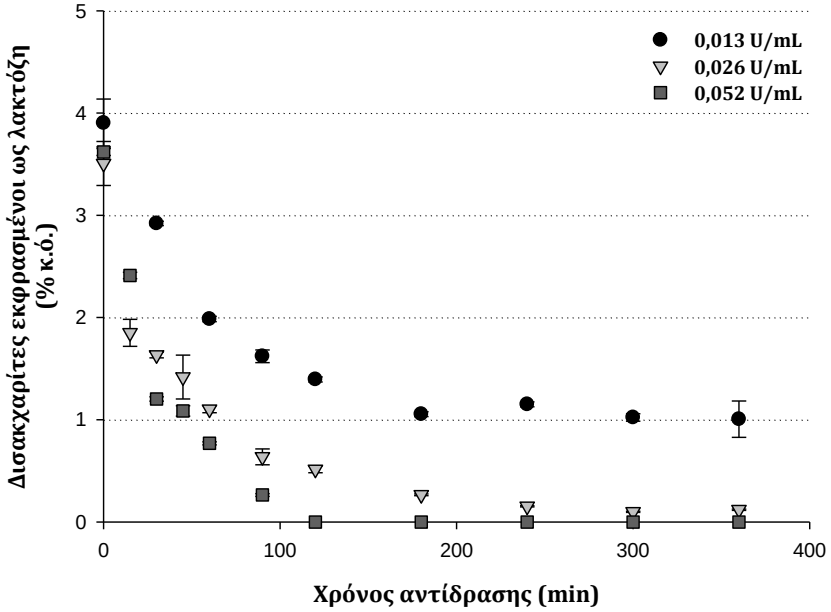


Διάγραμμα 5.16. *Μεταβολή μονοσακχαριτών εκφρασμένων ως γαλακτόζη σαν συνάρτηση του χρόνου αντίδρασης για συγκέντρωση υποστρώματος λακτόζης 14,0% κ.ό.*

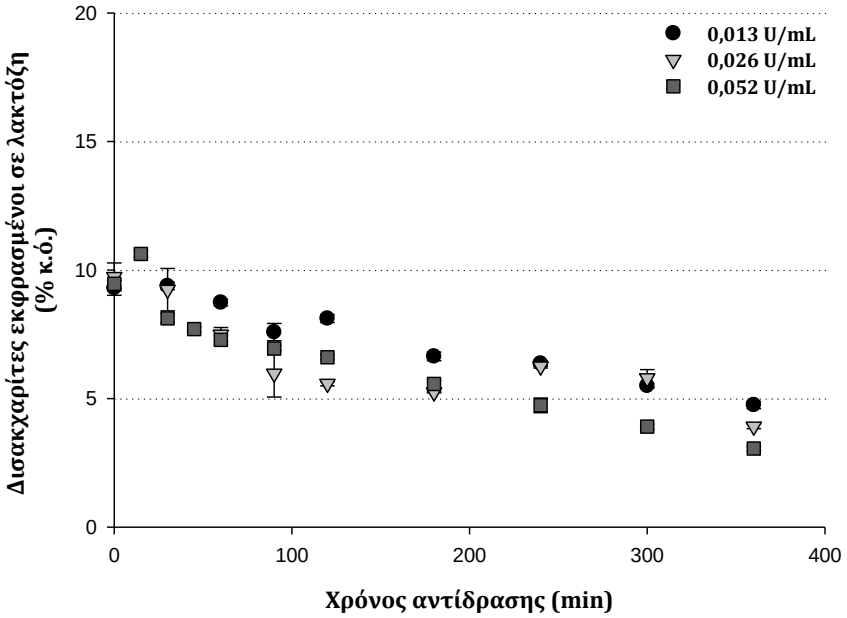


Διάγραμμα 5.17. *Μεταβολή μονοσακχαριτών εκφρασμένων ως γαλακτόζη σαν συνάρτηση του χρόνου αντίδρασης για υ συγκέντρωση υποστρώματος λακτόζης 17,0% κ.ό.*

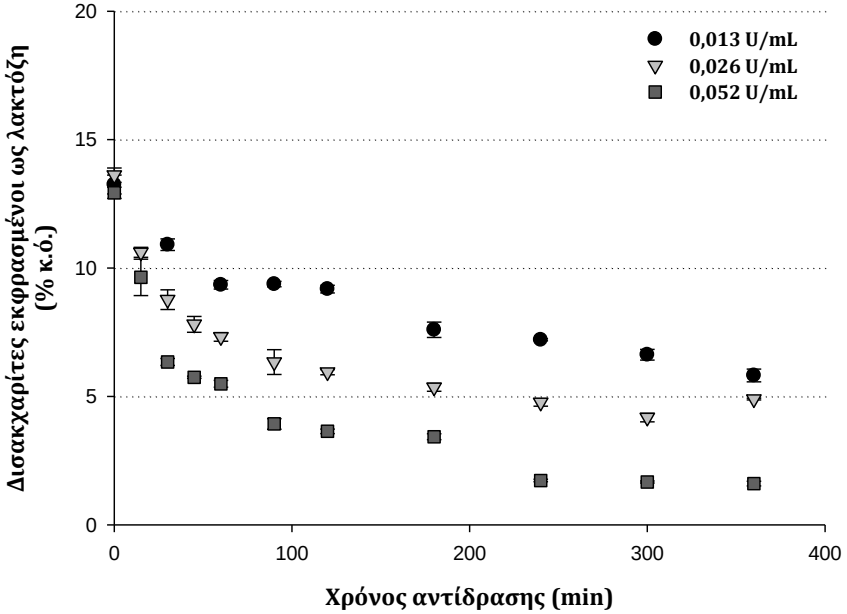
Στη συνέχεια παρατίθενται τα διαγράμματα της μεταβολής των δισακχαριτών συναρτήσει του χρόνου στο αντιδρών μίγμα, για υπόστρωμα όξινου ορού με περιεκτικότητα σε λακτόζη 3,5%, 9%, 14%. και 17% κ.ό. (Διαγράμματα 5.18, 5.19, 5.20 και 5.21, αντίστοιχα).



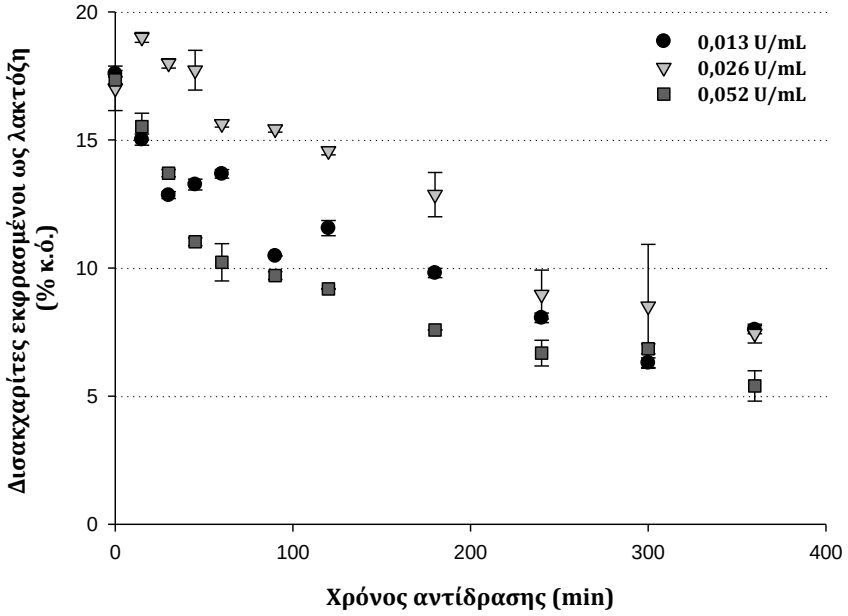
Διάγραμμα 5.18. *Μεταβολή δισακχαριτών εκφρασμένων ως λακτόζη σαν συνάρτηση του χρόνου αντίδρασης για συγκέντρωση υποστρώματος λακτόζης 3,5% κ.ό.*



Διάγραμμα 5.19. *Μεταβολή δισακχαριτών εκφρασμένων ως λακτόζη σαν συνάρτηση του χρόνου αντίδρασης για συγκέντρωση υποστρώματος λακτόζης 9,0% κ.ό.*



Διάγραμμα 5.20. *Μεταβολή δισακχαριτών εκφρασμένων ως λακτόζη σαν συνάρτηση του χρόνου αντίδρασης για συγκέντρωση υποστρώματος λακτόζης 14,0% κ.ό.*

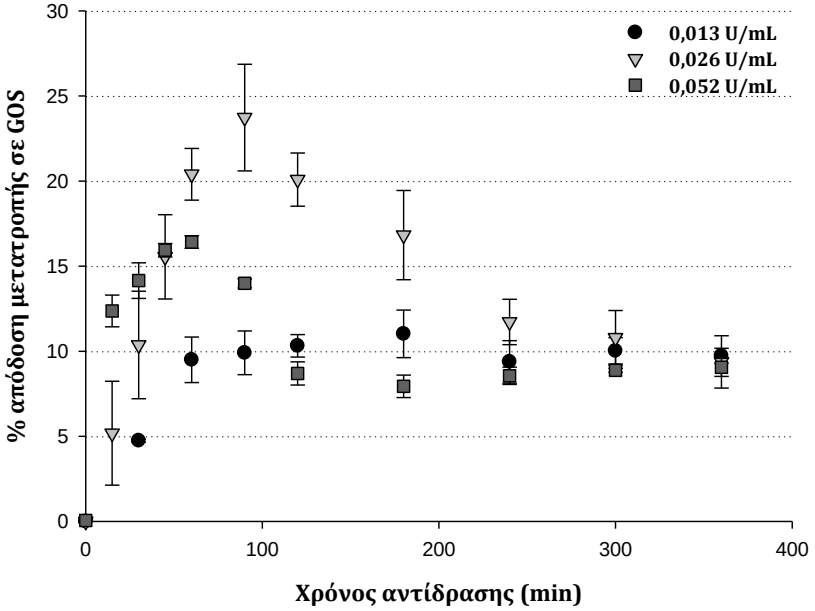


Διάγραμμα 5.21. *Μεταβολή δισακχαριτών εκφρασμένων ως λακτόζη σαν συνάρτηση του χρόνου αντίδρασης για συγκέντρωση υποστρώματος λακτόζης 17,0% κ.ό.*

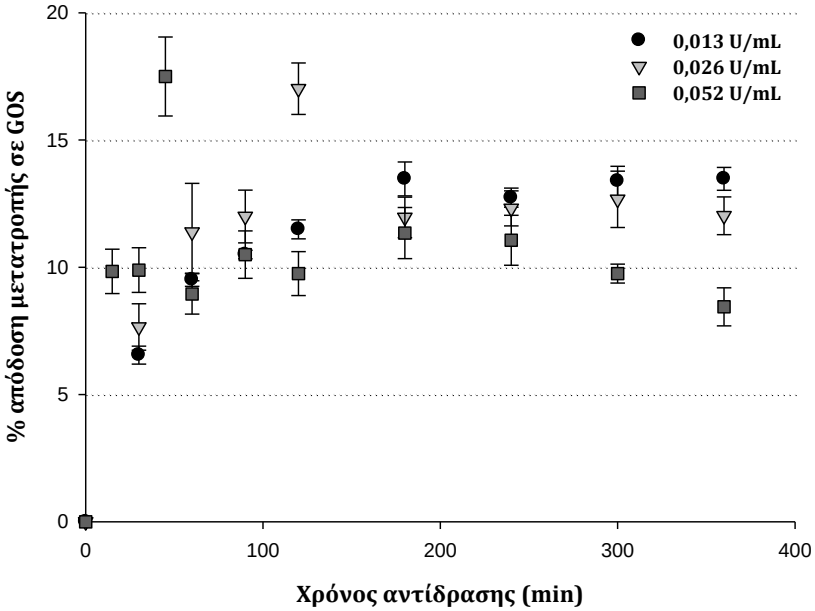
Όσον αφορά στη μεταβολή της συγκέντρωσης των δισακχαριτών με την πάροδο του χρόνου αντίδρασης, όπως παρατηρείται από τα παραπάνω διαγράμματα, ανεξάρτητα της αρχικής περιεκτικότητας του υποστρώματος σε λακτόζη, η συγκέντρωση των δισακχαριτών στο αντιδρών μίγμα διαρκώς μειώνεται, με τη μείωση αυτή να είναι ανάλογη της ενεργότητας του χρησιμοποιούμενου ενζύμου. Επιπρόσθετα, στα δείγματα αρχικής περιεκτικότητας σε λακτόζη 3,5% κ.ό., μετά το πέρας των 6 ωρών, παρατηρείται μηδενική συγκέντρωση δισακχαριτών στο αντιδρών σύστημα, γεγονός που πιθανόν να σχετίζεται με το ότι σε συνθήκες όπου δεν υπάρχει περίσσεια υποστρώματος (δισακχαριτών) ο ρυθμός υδρόλυσης είναι αρκετά μεγαλύτερος από το ρυθμό παραγωγής δι- και ολιγοσακχαριτών. Αυτό επιβεβαιώνεται και από τα αποτελέσματα στα δείγματα με υψηλότερη αρχική περιεκτικότητα σε λακτόζη (≥ 9% κ.ό.), όπου παρατηρούνται αρκετά υψηλότερες τελικές συγκεντρώσεις δισακχαριτών, ως αποτέλεσμα της αντίδρασης τρανσγαλακτοζυλίωσης και το σχηματισμό άλλων δισακχαριτών πλέον της λακτόζης.

Τέλος, παρακάτω παρουσιάζονται τα διαγράμματα του βαθμού απόδοσης σε GOS συναρτήσει του χρόνου στο αντιδρών μίγμα, για τις μελετώμενες αρχικές περιεκτικότητες του υποστρώματος σε λακτόζη (Διαγράμματα 5.22-5.25).

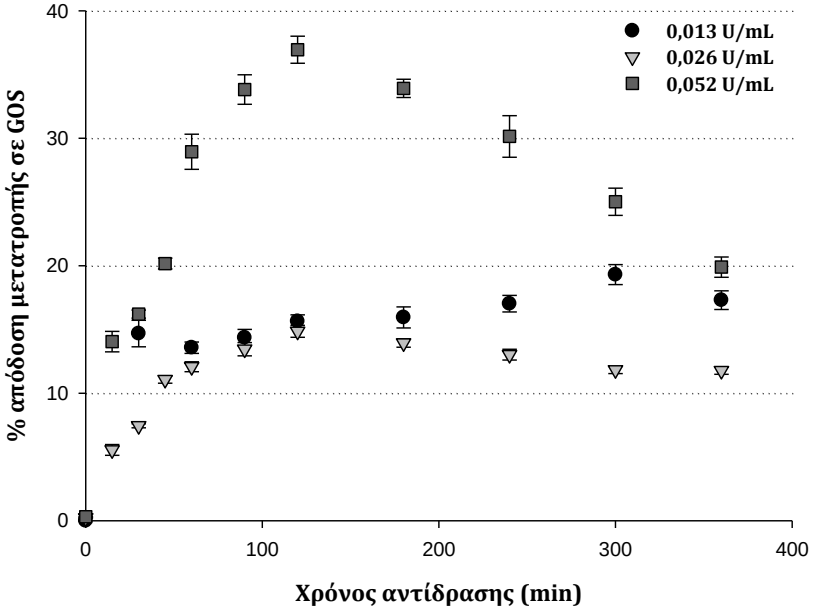
Από τα διαγράμματα επιβεβαιώνεται ότι η μέγιστη απόδοση σε GOS (37,0±1,06%) επιτυγχάνεται σε υπόστρωμα λακτόζης 14% κ.ό. (Διάγραμμα 5.21), για τη μέγιστη χρησιμοποιούμενη ενεργότητα ενζύμου (0,052 U/mL). Ακόμη, παρατηρείται ότι όσο αυξάνεται η ενεργότητα του ενζύμου αυξάνεται και η μέγιστη απόδοση σε GOS, και παράλληλα μειώνεται και ο χρόνος επίτευξης αυτού του μεγίστου, με εξαίρεση της περίπτωσης περιεκτικότητας υποστρώματος σε λακτόζη ίση με 3,5 % κ.ό., για την οποία παρατηρείται μέγιστος βαθμός απόδοσης σε GOS για ενεργότητα ενζύμου 0,026 U/mL (23,7±3.05).



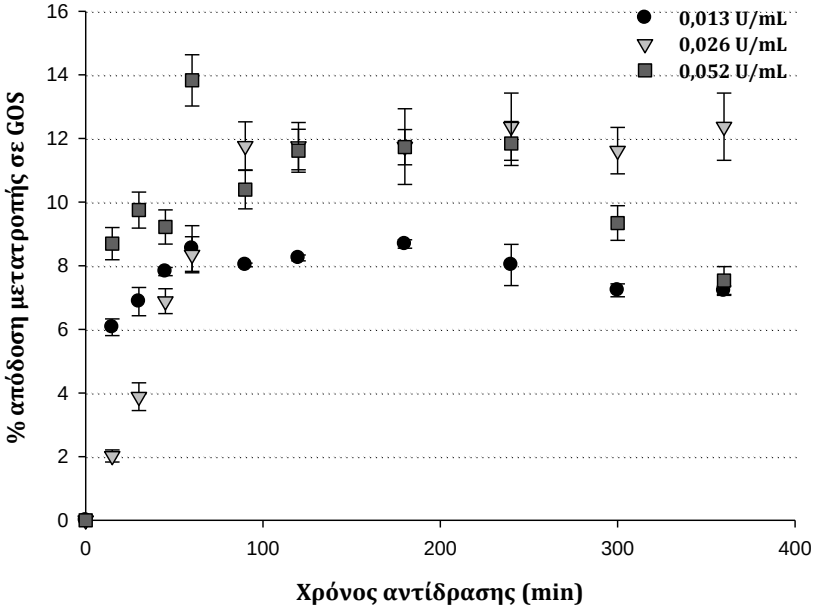
Διάγραμμα 5.22. *Μεταβολή της απόδοσης μετατροπής σε GOS εκφρασμένων ως ραφινόζη σαν συνάρτηση του χρόνου αντίδρασης για συγκέντρωση υποστρώματος λακτόζης 3,5% κ.ό.*



Διάγραμμα 5.23. *Μεταβολή της απόδοσης μετατροπής σε GOS εκφρασμένων ως ραφινόζη σαν συνάρτηση του χρόνου αντίδρασης για συγκέντρωση υποστρώματος λακτόζης 9,0% κ.ό.*



Διάγραμμα 5.24. *Μεταβολή της απόδοσης μετατροπής σε GOS εκφρασμένων ως ραφινόζη σαν συνάρτηση του χρόνου αντίδρασης για συγκέντρωση υποστρώματος λακτόζης 14,0% κ.ό.*

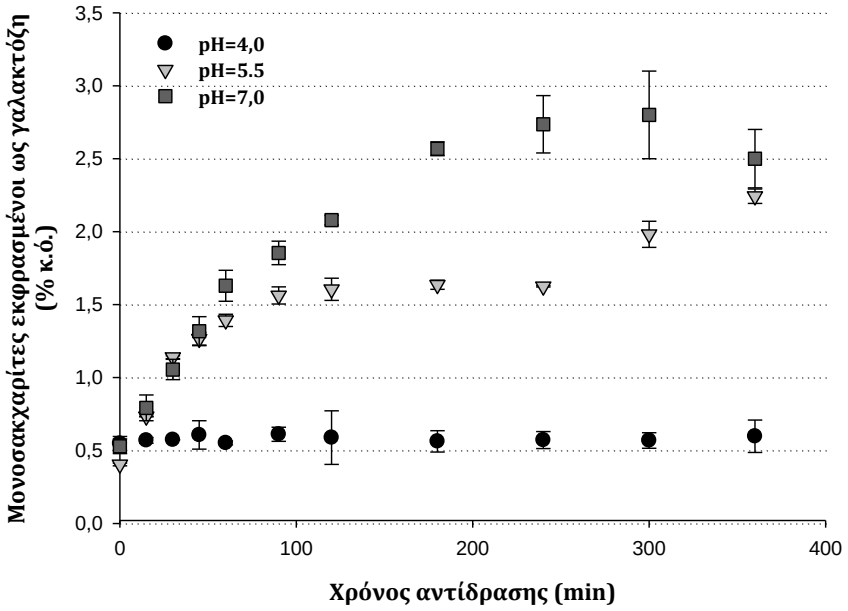


Διάγραμμα 5.25. *Μεταβολή της απόδοσης μετατροπής σε GOS εκφρασμένων ως ραφινόζη σαν συνάρτηση του χρόνου αντίδρασης για συγκέντρωση υποστρώματος λακτόζης 17,0% κ.ό.*

Από τα παραπάνω διαγράμματα παρατηρείται ακόμη ότι ανεξάρτητα από την περιεκτικότητα του υποστρώματος σε λακτόζη, αύξηση της ενεργότητας της χρησιμοποιούμενης β-γαλακτοζιδάσης, σε τιμές μεγαλύτερες των 0,026 U/mL, οδηγεί σε περαιτέρω υδρόλυση των σχηματιζόμενων GOS, για μεγάλους χρόνους αντίδρασης. Η συμπεριφορά αυτή παρατηρείται εντονότερα στην περίπτωση της περιεκτικότητας υποστρώματος 3,5% κ.ό. σε λακτόζη, στην οποία για αυξημένες ενεργότητες ενζύμου, όπου παρατηρείται πλήρης κατανάλωση των δισακχαριτών, όπως αναφέρθηκε παραπάνω, η ενζυμική δράση τείνει προς την υδρόλυση των σχηματιζόμενων προϊόντων.

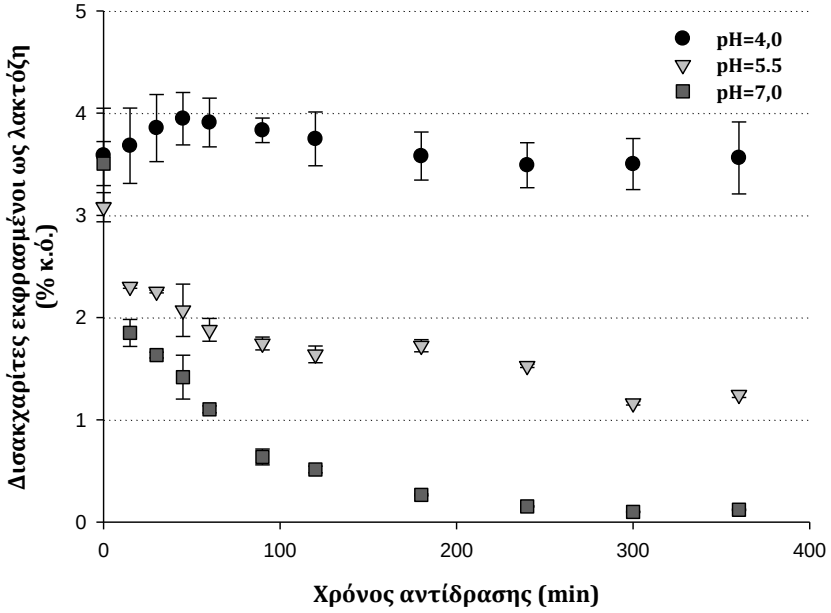
5.2.3 Επίδραση της τιμής του pH στην ενζυμική διεργασία μετατροπής της λακτόζης του όξινου ορού σε GOS

Σε δεύτερο χρόνο μελετήθηκε η επίδραση της τιμής του pH του αντιδρώντος συστήματος στην απόδοση της ενζυμικής αντίδρασης ολιγομερισμού της λακτόζης του όξινου ορού. Στα παρακάτω διαγράμματα (5.26-5.28) παρουσιάζεται η μεταβολή της συγκέντρωσης των μονοσακχαριτών και των δισακχαριστών, καθώς ο βαθμός απόδοσης σε GOS, συναρτήσει του χρόνου της ενζυμικής αντίδρασης, για κάθε τιμή pH του υποστρώματος. Όλες οι ενζυμικές αντιδράσεις πραγματοποιήθηκαν σε θερμοκρασία 37ºC, με αρχική περιεκτικότητα του υποστρώματος σε λακτόζη 3,5% κ.ό και ενεργότητα β-γαλακτοζιδάσης ίση με 0,026 U/mL.

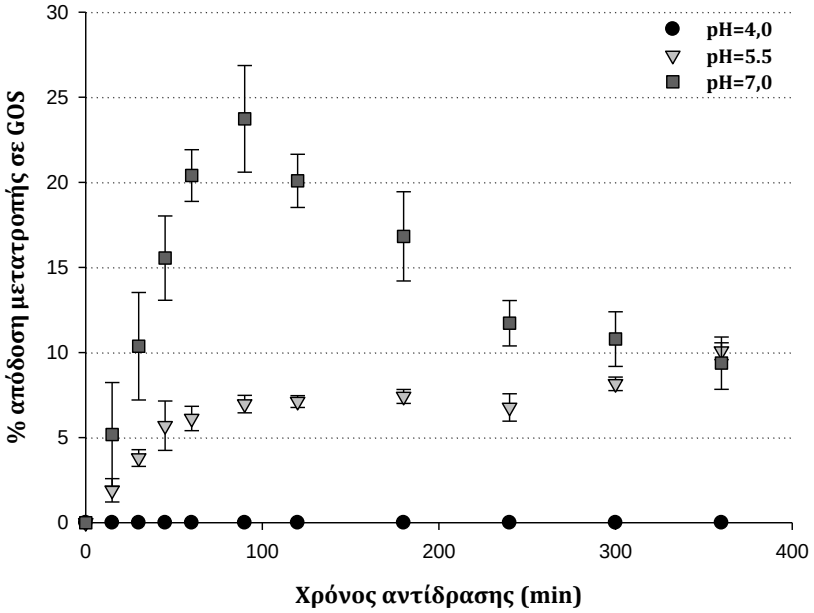


Διάγραμμα 5.26. *Επίδραση του pH στη μεταβολή των μονοσακχαριτών εκφρασμένων ως γαλακτόζη σαν συνάρτηση του χρόνου αντίδρασης*

Παρατηρείται ότι οι μονοσακχαρίτες παραμένουν σχεδόν σταθεροί στην περίπτωση χρήσης υποστρώματος με τιμή pH ίση με 4, υποδηλώνοντας τη μη πραγματοποίηση της αντίδρασης σε αυτή την τιμή pH. Αυτό επιβεβαιώνεται και από το διάγραμμα του βαθμού απόδοσης σε GOS, από το οποίο παρατηρείται μηδενική απόδοση σε GOS καθόλη τη διάρκεια της ενζυμικής αντίδρασης σε αυτή την τιμή pH του υποστρώματος. Σε τιμή pH=5,5 παρατηρείται ότι αν και το ένζυμο είναι ικανό να καταλύσει αντιδράσεις υδρόλυσης και τρανσγαλακτοζυλίωσης, ωστόσο παρατηρούνται χαμηλότεροι βαθμοί απόδοσης σε GOS σε σχέση με αυτούς που επιτυγχάνονται όταν η αντίδραση πραγματοποιείται σε υπόστρωμα με τιμή pH=7. Από το Διάγραμμα 5.28 παρατηρείται ότι σε υπόστρωμα με τιμή pH=7 το ένζυμο δρα με το βέλτιστο τρόπο, καθώς επιτυγχάνεται ο μέγιστος βαθμός απόδοσης σε GOS, που είναι και το επιθυμητό αποτέλεσμα της αντίδρασης. Η παρατήρηση αυτή επιβεβαιώνει προηγούμενες βιβλιογραφικές αναφορές, οι οποίες αναφέρουν ότι η β-γαλακτοζιδάση από τον *K. lactis* εμφανίζει βέλτιστο pH δράσης στην ουδέτερη περιοχή pH (6,8-7,0). Μάλιστα, παρατηρείται ότι εκτός από την αύξηση της μέγιστης απόδοσης σε GOS, σε τιμή pH=7,0 μειώνεται κατά 4 φορές και ο χρόνος επίτευξης αυτής (Πίνακας 5.3).



Διάγραμμα 5.27. *Επίδραση του pH στη μεταβολή των δισακχαριτών εκφρασμένων ως λακτόζη σαν συνάρτηση του χρόνου αντίδρασης*



Διάγραμμα 5.28. *Επίδραση του pH στο βαθμό απόδοσης σε GOS εκφρασμένων ως ραφινόζη σαν συνάρτηση του χρόνου αντίδρασης*

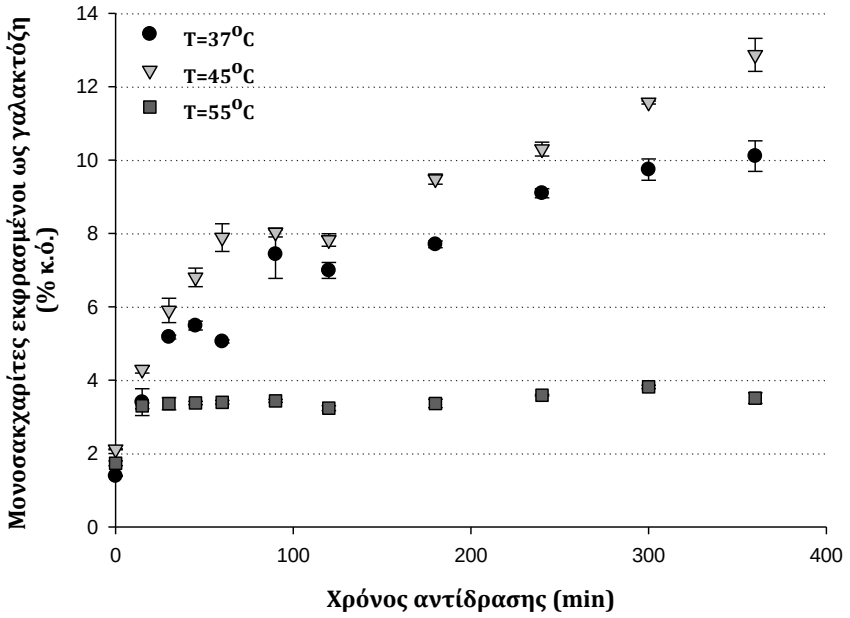
Πίνακας 5.3. *Μέγιστοι βαθμοί απόδοσης σε GOS συναρτήσει της τιμής pH του υποστρώματος, για συγκέντρωση λακτόζης 3,5% κ.ό., ενεργότητα β-γαλακτοζιδάσης 0,026 U/mL και θερμοκρασία αντίδρασης 37°C.*

pH αντίδρασης	Μέγιστη % απόδοση σε GOS*	Χρόνος επίτευξης μέγιστης απόδοσης σε GOS (min)
4,0	$0,00^{a}$ ±0,00	καμία ενζυμική δράση
5,5	$10,1^{b}$ ±0,50	360
7,0	$23,7^{c}$ ±3,05	90

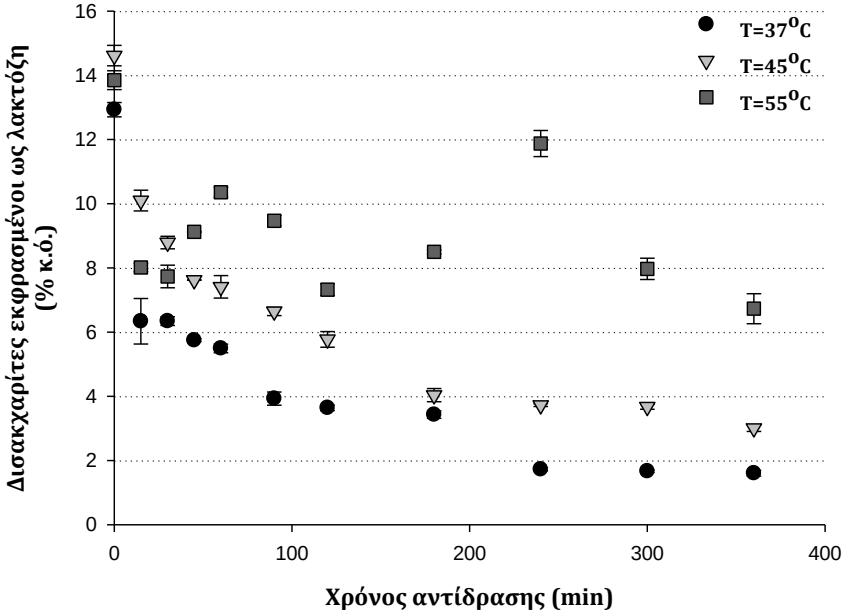
*Οι τιμές είναι οι μέσοι όροι ± τυπική απόκλιση τριών μετρήσεων και δύο πειραματικών σειρών (n=6).
Τα διαφορετικά γράμματα μεταξύ των γραμμών δείχνουν στατιστικά σημαντική διαφορά ($p<0,05$) μεταξύ των εξεταζόμενων δειγμάτων με βάση τη δοκιμή σύγκρισης μέσων όρων του Duncan (Duncan's mean values post hoc comparison test).

5.2.4 Επίδραση της θερμοκρασίας στην ενζυμική διεργασία μετατροπής της λακτόζης του όξινου ορού σε GOS

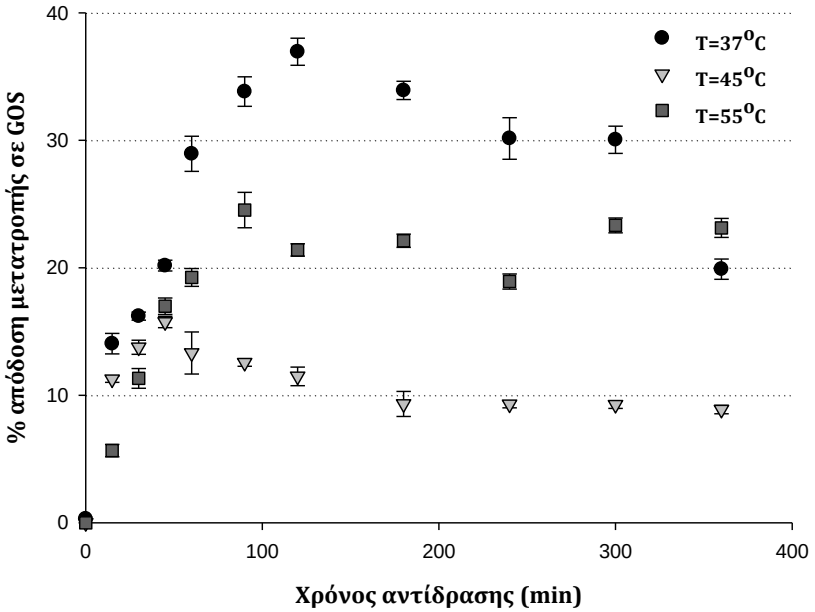
Παράλληλα μελετήθηκε η επίδραση της θερμοκρασίας στην ενζυμική διεργασία μετατροπής της λακτόζης του όξινου ορού σε GOS. Παρακάτω παρουσιάζονται τα διαγράμματα της μεταβολής της συγκέντρωσης μονοσακχαριτών και δισακχαριτών, καθώς και ο βαθμός απόδοσης σε GOS, συναρτήσει του χρόνου της ενζυμικής αντίδρασης, για κάθε τιμή θερμοκρασίας της αντίδρασης. Βιβλιογραφικά, η θερμοκρασία των 37°C παρουσιάζεται ως βέλτιστη για την ενζυμική αντίδραση. Παράλληλα εξετάστηκαν οι θερμοκρασίες των 45 και 55°C. Όλες οι ενζυμικές αντιδράσεις πραγματοποιήθηκαν σε τιμή pH 7,0 με αρχική περιεκτικότητα του υποστρώματος σε λακτόζη 14% κ.ό και ενεργότητα β-γαλακτοζιδάσης ίση με 0,052 U/mL.



Διάγραμμα 5.29. *Επίδραση της θερμοκρασίας στη μεταβολή των μονοσακχαριτών εκφρασμένων ως γαλακτόζη συναρτήσει του χρόνου αντίδρασης*



Διάγραμμα 5.30. *Επίδραση της θερμοκρασίας στη μεταβολή των δισακχαριτών εκφρασμένων ως λακτόζη συναρτήσει του χρόνου αντίδρασης*



Διάγραμμα 5.31. *Επίδραση της θερμοκρασίας στο βαθμό απόδοσης σε GOS εκφρασμένων ως ραφινόζη συναρτήσει του χρόνου αντίδρασης*

Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι οι καλύτεροι βαθμοί απόδοσης σε GOS επιτυγχάνονται στους 37°C, ακολουθούμενους από αυτούς στους 55 και 45°C. Επιπλέον, παρατηρήθηκε ότι στη θερμοκρασία των 45°C το ένζυμο τείνει στην κατάλυση αντιδράσεων υδρόλυσης παρά ολιγομερισμού (τελική συγκέντρωση μονοσακχαριτών 10,1±0,42%, 12,9±0,45% και 3,51±0,1% κ.ό. για τους 37, 45 και 55°C, αντίστοιχα). Αναφορικά με την ενζυμική αντίδραση στους 45°C και 55°C, παρατηρήθηκε μικρότερη τιμή για το μέγιστο βαθμό απόδοσης σε GOS σε σχέση με την αντίστοιχη τιμή για τους 37°C, υποδηλώνοντας ότι το ένζυμο σε

θερμοκρασία 45°C ή μεγαλύτερη χάνει τη θερμοσταθερότητά του, και άρα μειώνεται η ενεργότητά του με την πάροδο του χρόνου. Έτσι, παρατηρείται ότι μετά από 180 min αντίδρασης, η συγκέντρωση των παραγόμενων GOS διατηρεί μία περίπου σταθερή τιμή, χωρίς να παρατηρείται περαιτέρω υδρόλυση των προϊόντων της ενζυμικής αντίδρασης, κάτι που δεν φαίνεται να ισχύει για τους 37°C.

Στη συνέχεια παρουσιάζονται συνοπτικά οι μέγιστοι βαθμοί απόδοσης σε GOS, καθώς και ο αντίστοιχος χρόνος επίτευξή τους, σε κάθε μία από τις θερμοκρασίες που μελετήθηκαν (Πίνακας 5.4).

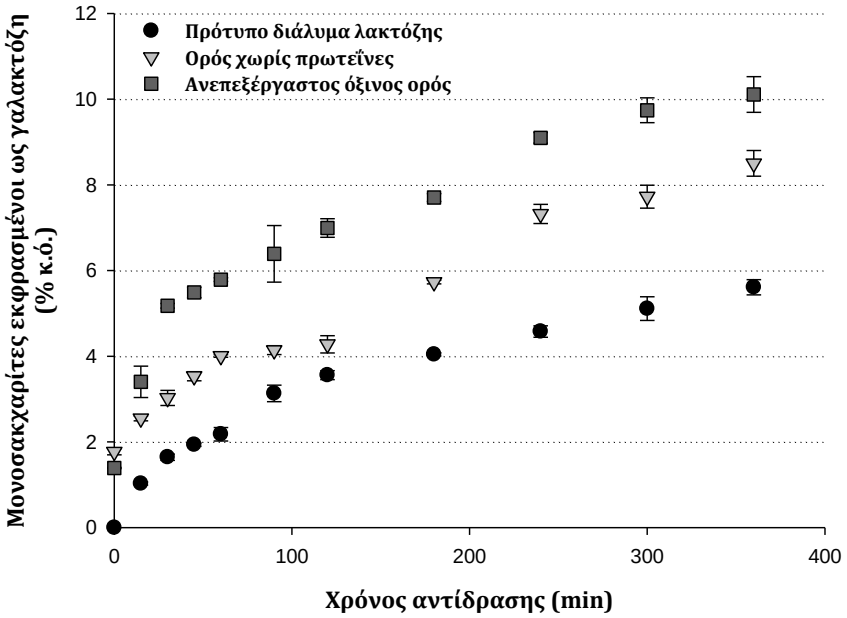
Πίνακας 5.4. *Μέγιστοι βαθμοί απόδοσης σε GOS συναρτήσει της θερμοκρασίας αντίδρασης, για συγκέντρωση λακτόζης 14 % κ.ό., ενεργότητα β-γαλακτοζιδάσης 0,052 U/mL και τιμή pH ίση με 7,0.*

Θερμοκρασία αντίδρασης (ºC)	**Μέγιστη % απόδοση σε GOS***	**Χρόνος επίτευξης μέγιστης απόδοσης σε GOS (min)**
37	$37,0^{c}$ ±1,06	120
45	$15,8^{a}$ ±0,45	45
55	$25,5^{b}$ ±0,77	90

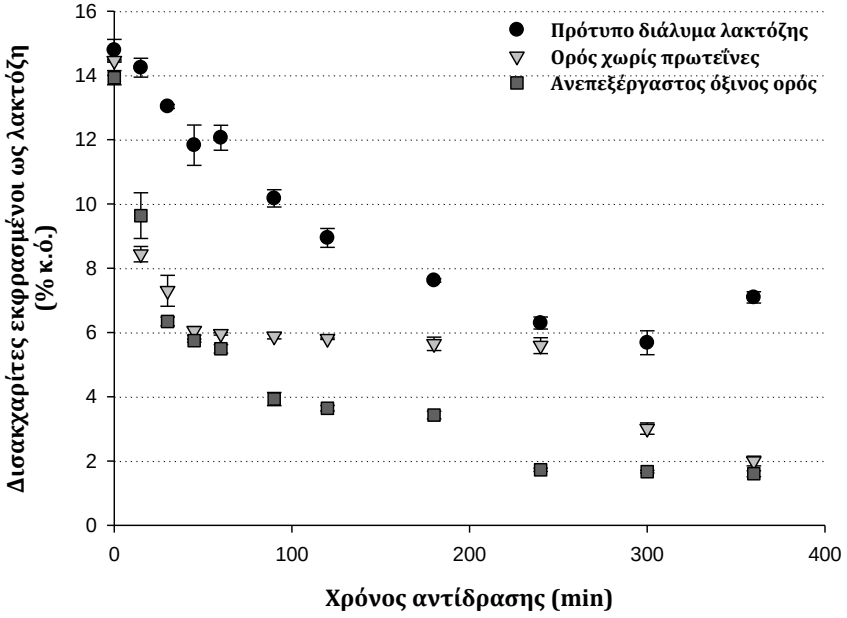
*Οι τιμές είναι οι μέσοι όροι ± τυπική απόκλιση τριών μετρήσεων και δύο πειραματικών σειρών (n=6).
Τα διαφορετικά γράμματα μεταξύ των γραμμών δείχνουν στατιστικά σημαντική διαφορά ($p<0,05$) μεταξύ των εξεταζόμενων δειγμάτων με βάση τη δοκιμή σύγκρισης μέσων όρων του Duncan (Duncan's mean values post hoc comparison test).

5.2.5 Επίδραση των συστατικών του υποστρώματος στην ενζυμική διεργασία μετατροπής της λακτόζης του όξινου ορού σε GOS

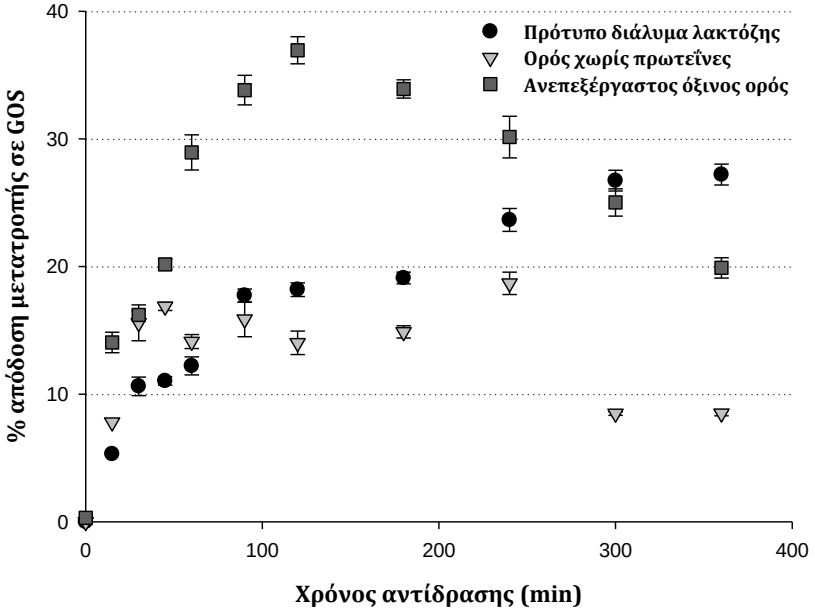
Τελευταίος παράγοντας που μελετήθηκε ήταν της παρουσίας των λοιπών συστατικών του υποστρώματος πλέον της λακτόζης (πρωτεΐνες-άλατα) στην απόδοση της ενζυμικής αντίδρασης. Παρακάτω παρουσιάζονται τα διαγράμματα μετατροπής μονοσακχαριτών και δισακχαριτών, καθώς και ο βαθμός απόδοσης σε GOS, για τις διάφορες περιπτώσεις. Όλες οι ενζυμικές αντιδράσεις πραγματοποιήθηκαν σε θερμοκρασία 37ºC, τιμή pH υποστρώματος ίση με 7,0, με αρχική περιεκτικότητα του υποστρώματος σε λακτόζη 14% κ.ό και ενεργότητα β-γαλακτοζιδάσης ίση με 0,052 U/mL.



Διάγραμμα 5.32. *Επίδραση των συστατικών του υποστρώματος στη μεταβολή των μονοσακχαριτών εκφρασμένων ως γαλακτόζη συναρτήσει του χρόνου αντίδρασης*



Διάγραμμα 5.33. *Επίδραση των συστατικών του υποστρώματος στη μεταβολή των δισακχαριτών εκφρασμένων ως λακτόζη συναρτήσει του χρόνου αντίδρασης*



Διάγραμμα 5.34. *Επίδραση των συστατικών του υποστρώματος στο βαθμό απόδοσης σε GOS εκφρασμένων ως ραφινόζη συναρτήσει του χρόνου αντίδρασης*

Αρχικά, όσον αφορά στην παραγωγή μονοσακχαριτών αυτή εμφανίζεται μεγαλύτερη στην περίπτωση του ανεπεξέργαστου ορού, ακολουθούμενη από την περίπτωση του ορού από τον οποίο έχουν απομακρυνθεί μέσω υπερδιήθησης οι πρωτεΐνες και την περίπτωση του πρότυπου διαλύματος λακτόζης, στο οποίο εμφανίζεται η μικρότερη παραγωγή

μονοσακχαριτών. Αναφορικά με τη μεταβολή της συγκέντρωσης δισακχαριτών στο αντιδρών μίγμα, παρατηρήθηκε συνεχόμενη μείωση αυτής, υποδηλώνοντας ότι κατά τη διάρκεια της αντίδρασης δεν υδρολύεται μόνο η περιεχόμενη λακτόζη, αλλά πιθανόν και οι νέοι σχηματιζόμενοι δισακχαρίτες. Τέλος, ο βαθμός απόδοσης σε GOS εμφάνισε συνεχόμενη αύξηση, ακόμα και μετά από 360 min, με εξαίρεση την περίπτωση του ανεπεξέργαστου ορού, όπου μεγιστοποιήθηκε μετά από 120 min στην τιμή 37,0±1,06% και στη συνέχεια παρουσίασε μείωση των τιμών του. Οι παρατηρούμενες διαφορές λόγω της διαφορετικότητας των συστατικών του υποστρώματος μπορούν να εξηγηθούν με βάση βιβλιογραφικά δεδομένα αναφορικά με τη δράση διαφόρων αλάτων ως υποκινητές της β-γαλακτοζιδάσης από τον *K. lactis*. Η θετική επίδραση που εμφάνισε η παρουσία πρωτεϊνών στο αντιδρών σύστημα δεν έχει αναφερθεί σε παλαιότερες έρευνες και χρήζει περαιτέρω πειραματικής μελέτης.

Παρακάτω, παρουσιάζονται συνοπτικά οι μέγιστοι βαθμοί απόδοσης σε GOS και οι αντίστοιχοι χρόνοι επίτευξής τους, για κάθε μελετώμενο σύστημα.

Πίνακας 5.5. *Μέγιστοι βαθμοί απόδοσης σε GOS για τις διαφορετικές περιπτώσεις υποστρώματος, για συγκέντρωση λακτόζης 14 % κ.ό., ενεργότητα β-γαλακτοζιδάσης 0,052 U/mL, θερμοκρασία αντίδρασης 37°C και τιμή pH ίση με 7,0.*

Σύσταση υποστρώματος	**Μέγιστη % απόδοση σε GOS***	**Χρόνος επίτευξης μέγιστης απόδοσης σε GOS (min)**
Πρότυπο διάλυμα λακτόζης	$27,2^{b}$ ±0,82	360
Ορός χωρίς πρωτεΐνες	$18,7^{a}$ ±0,88	240
Ανεπεξέργαστος όξινος ορός	$37,0^{c}$ ±1,06	120

*Οι τιμές είναι οι μέσοι όροι ± τυπική απόκλιση τριών μετρήσεων και δύο πειραματικών σειρών (n=6).
Τα διαφορετικά γράμματα μεταξύ των γραμμών δείχνουν στατιστικά σημαντική διαφορά ($p<0,05$) μεταξύ των εξεταζόμενων δειγμάτων με βάση τη δοκιμή σύγκρισης μέσων όρων του Duncan (Duncan's mean values post hoc comparison test).

5.2.6 Σύνοψη των αποτελεσμάτων

Στον Πίνακα 5.6 παρουσιάζονται συγκεντρωτικά οι μέγιστοι βαθμοί απόδοσης σε GOS για όλες τις διαφορετικές περιπτώσεις που μελετήθηκαν και παρουσιάστηκαν στις προηγούμενες ενότητες, ώστε να προσδιορισθούν οι βέλτιστες συνθήκες της ενζυμικής αντίδρασης ολιγομερισμού της λακτόζης του όξινου ορού για την παραγωγή GOS.

Από τον παρακάτω πίνακα προκύπτει ότι οι βέλτιστες συνθήκες πραγματοποίησης της ενζυμικής διεργασίας μετατροπής της λακτόζης που περιέχεται στον όξινο ορό σε GOS είναι για περιεκτικότητα υποστρώματος σε λακτόζη 14% κ.ό., με ενεργότητα β-γαλακτοζιδάσης 0,052 U/mL, σε τιμή pH υποστρώματος ίση με 7,0 και σε θερμοκρασία αντίδρασης 37°C. Υπό αυτές τις συνθήκες αντίδρασης επιτεύχθηκε μέγιστος βαθμός απόδοσης σε GOS ίσος με 37,0±1,06%, έπειτα από 120 min αντίδραση.

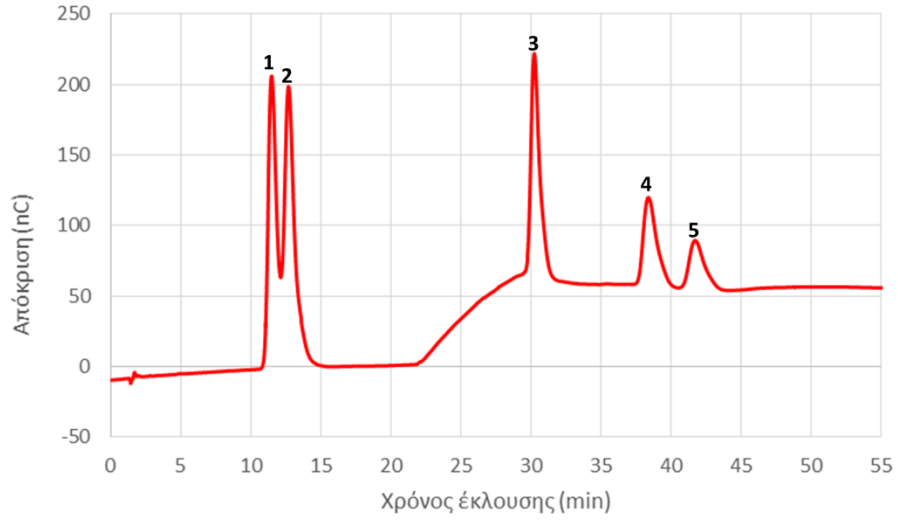
Πίνακας 5.6. *Συνολικός πίνακας αποτελεσμάτων των μέγιστων βαθμών απόδοσης σε GOS και των αντίστοιχων χρόνων επίτευξής τους για κάθε μελετώμενη ενζυμική αντίδραση*

Συγκέντρωση λακτόζης (% w/v)	**Ενεργότητα ενζύμου (U/mL)**	**Θερμοκρασία (ºC)**	**pH αντίδρασης**	**Σύσταση υποστρώματος**	**Μέγιστη % απόδοση σε GOS***	**Χρόνος επίτευξης μέγιστης απόδοσης σε GOS (min)**
3,5	0,013	37	7,0	Ανεπεξέργαστος ορός	12,8±1,28	90
	0,026		4,0		0,00±0,00	καμία ενζυμική δράση
			5,5		10,1±0,50	360
			7,0		23,7±3,05	90
	0,052		7,0		16,4±0,37	60
9,0	0,013	37	7,0	Ανεπεξέργαστος ορός	13,5±0,45	180
	0,026				17,0±1,01	120
	0,052				17,5±1,55	45
14,0	0,013	37	7,0	Ανεπεξέργαστος ορός	19,3±0,78	300
	0,026				14,9±0,47	120
	0,052				37,0±1,06	120
	0,052	37		Ορός χωρίς πρωτεΐνες	18,7±0,88	240
				Πρότυπο διάλυμα λακτόζης	27,2±0,82	360
	0,052	45		Ανεπεξέργαστος ορός	15,8±0,45	45
		55			25,5±0,77	90
17,0	0,013	37	7,0	Ανεπεξέργαστος ορός	8,68±0,13	180
	0,026				11,8±0,76	90
	0,052				13,8±0,81	60

5.3 Ανάλυση των δειγμάτων σε σύστημα HPLC και HPAEC-PAD

Όπως ήδη αναφέρθηκε, η βασική διαφορά της υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (HPLC) με τη χρωματογραφία ανιονεναλλαγής υψηλής απόδοσης με παλμικό αμπερομετρικό ανιχνευτή (HPAEC-PAD) είναι η διαχωριστική τους ικανότητα, σε σχέση με την ικανότητα διαχωρισμού ενώσεων ίδιου βαθμού πολυμερισμού με διαφορετικά μονομερή ή/και διαφορετικούς γλυκοζιτικούς δεσμούς. Με το σύστημα HPLC έγινε ένας πρώτος διαχωρισμός σε μονοσακχαρίτες, δισακχαρίτες και ολιγοσακχαρίτες, ενώ με το σύστημα HPAEC-PAD ήταν εφικτός ο διαχωρισμός των επιμέρους σακχάρων.

Παρακάτω παρουσιάζονται χαρακτηριστικά χρωματογραφήματα των δειγμάτων που επιλέχθηκαν να αναλυθούν σε σύστημα HPAEC-PAD. Τα δείγματα αυτά δεν επιλέχθηκαν τυχαία, αλλά με βάση τη μέγιστη απόδοση σε GOS σε κάθε μία από τις μελετώμενες συνθήκες που αναφέρθηκαν (Παράγραφος 6.6). Ακόμη, αναφέρεται ότι δεν έγινε προσαρμογή πρότυπων καμπυλών στο σύστημα HPAEC-PAD και η παρακάτω ανάλυση είναι ποιοτική, με βάση τους χρόνους έκλουσης πρότυπων σακχάρων (Εικόνα 5.1, Πίνακας 5.7).

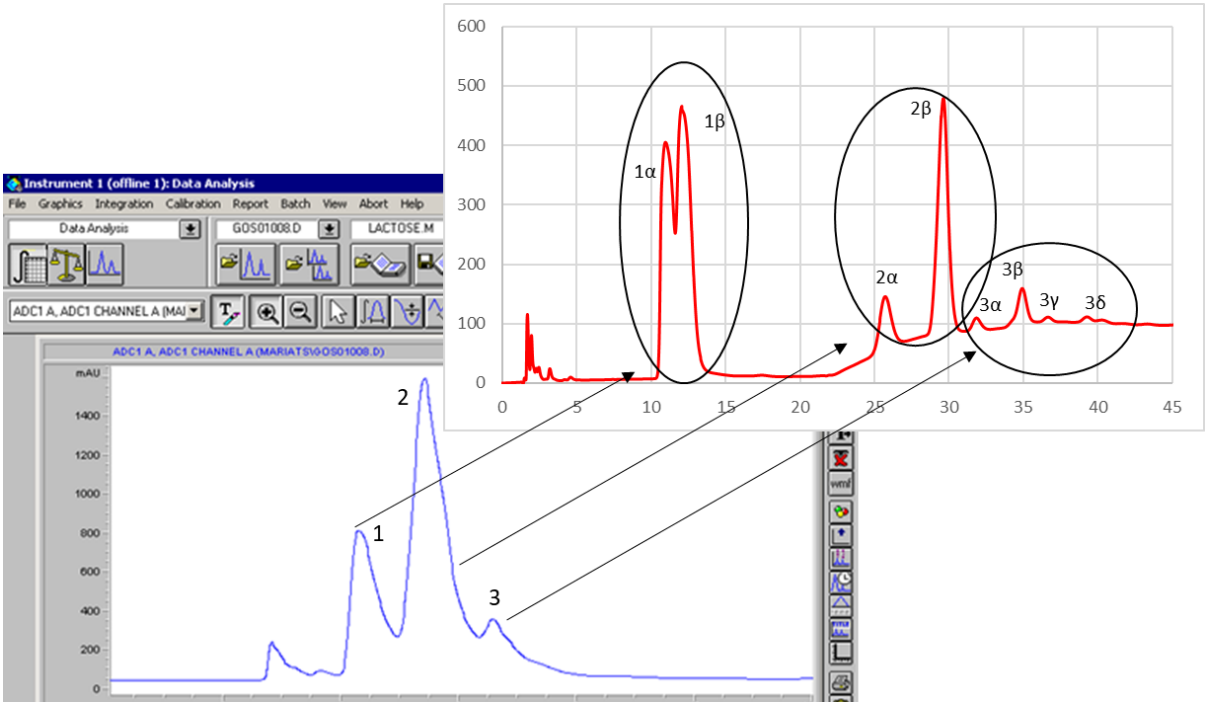


Εικόνα 5.1. *Χρωματογράφημα ανάλυσης πρότυπων σακχάρων στο σύστημα HPAEC-PAD (1: γαλακτόζη, 2: γλυκόζη, 3: λακτόζη, 4: ραφινόζη, και 5: σταχυόζη).*

Πίνακας 5.7. *Χρόνοι έκλουσης πρότυπων σακχάρων στο σύστημα HPAEC-PAD.*

Ουσία	Χρόνος έκλουσης (min)	Συμβολισμός
Γαλακτόζη (galactose)	9,4	α-Gal
Γλυκόζη (glucose)	10,1	α-Glc
Λακτόζη (lactose)	23,0	Gal(β1→4)Glc
Ραφινόζη (raffinose)	28,1	Gal(α1→6α)Glc(α1→2β)Fru
Σταχυόζη (stachyose)	31,2	Gal(α1→6)Gal(α1→6)Glc(α1→2β)Fru

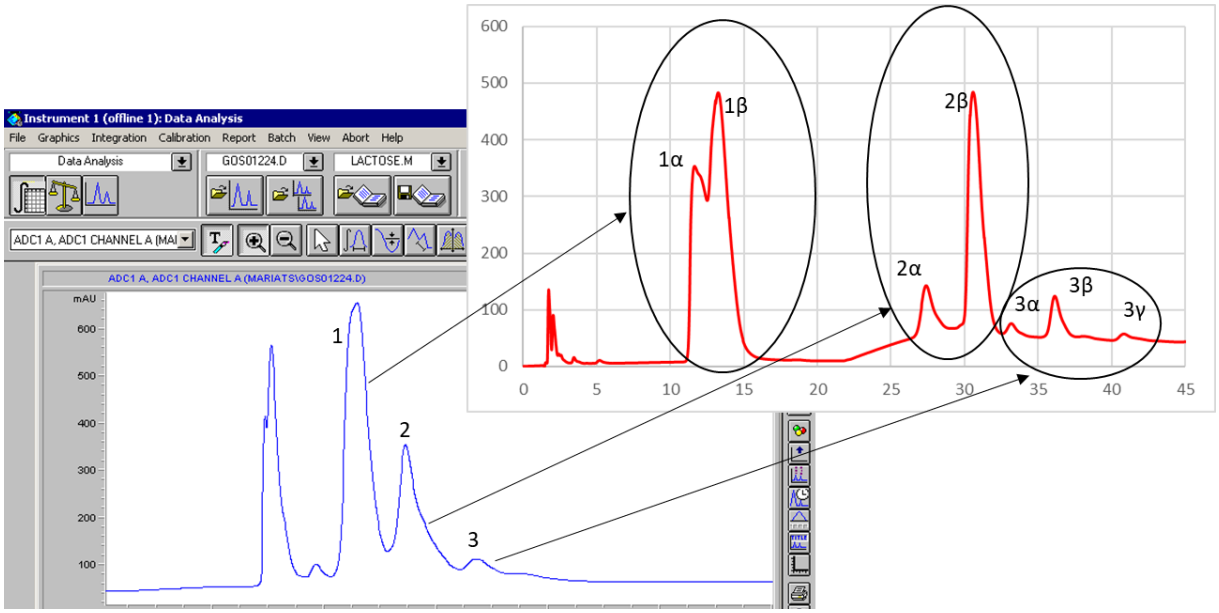
Αρχικά, αναλύθηκε το δείγμα που λήφθηκε σε χρόνο 120 min (χρόνος επίτευξης μέγιστης απόδοσης) της ενζυμικής αντίδρασης που πραγματοποιήθηκε σε υπόστρωμα ορού 14% κ.ό. συγκέντρωσης λακτόζης με ένζυμο β-γαλακτοζιδάσης ενζυμικής ενεργότητας 0,052 U/mL, σε τιμή pH 7,0 και θερμοκρασία αντίδρασης 37°C, που αποτέλεσε και τις βέλτιστες συνθήκες δράσης του ενζύμου ως προς την επίτευξη μέγιστης απόδοσης σε GOS. Τα χρωματογραφήματα του δείγματος που λήφθηκαν από το σύστημα HPLC και HPAEC-PAD, παρουσιάζονται συγκριτικά παρακάτω.



Εικόνα 5.2. *Συγκριτικά χρωματογραφήματα HPLC και HPAEC-PAC από την ενζυμική αντίδραση σε υπόστρωμα ορού 14% κ.ό. συγκέντρωσης λακτόζης με ένζυμο β-γαλακτοζιδάσης ενζυμικής ενεργότητας 0,052U/mL, σε τιμή pH 7,0 και θερμοκρασία αντίδρασης 37°C*

Αριστερά παρουσιάζεται το χρωματογράφημα που λήφθηκε από το σύστημα HPLC, όπου με τα νούμερα 1,2 και 3 παρουσιάζονται οι μονοσακχαρίτες, δισακχαρίτες και ολιγοσακχαρίτες αντίστοιχα. Με την ανάλυση του δείγματος στο σύστημα HPAEC-PAD (δεξί χρωματογράφημα) έγινε διαχωρισμός των επιμέρους σακχάρων, τα οποία αναγνωρίστηκαν με βάση τους χρόνους έκλουσης των πρότυπων ουσιών και βιβλιογραφικών πηγών (Urrutia et al., 2013). Ως (1α) και (1β) παρουσιάζονται οι κορυφές της γαλακτόζης και της γλυκόζης αντίστοιχα , ως (2α) και (2β) της 6-γαλακτοβιόζης και της λακτόζης, ενώ οι υπόλοιπες κορυφές ανήκουν σε ολιγοσακχαρίτες με βαθμό πολυμερισμού 2 ή 3.

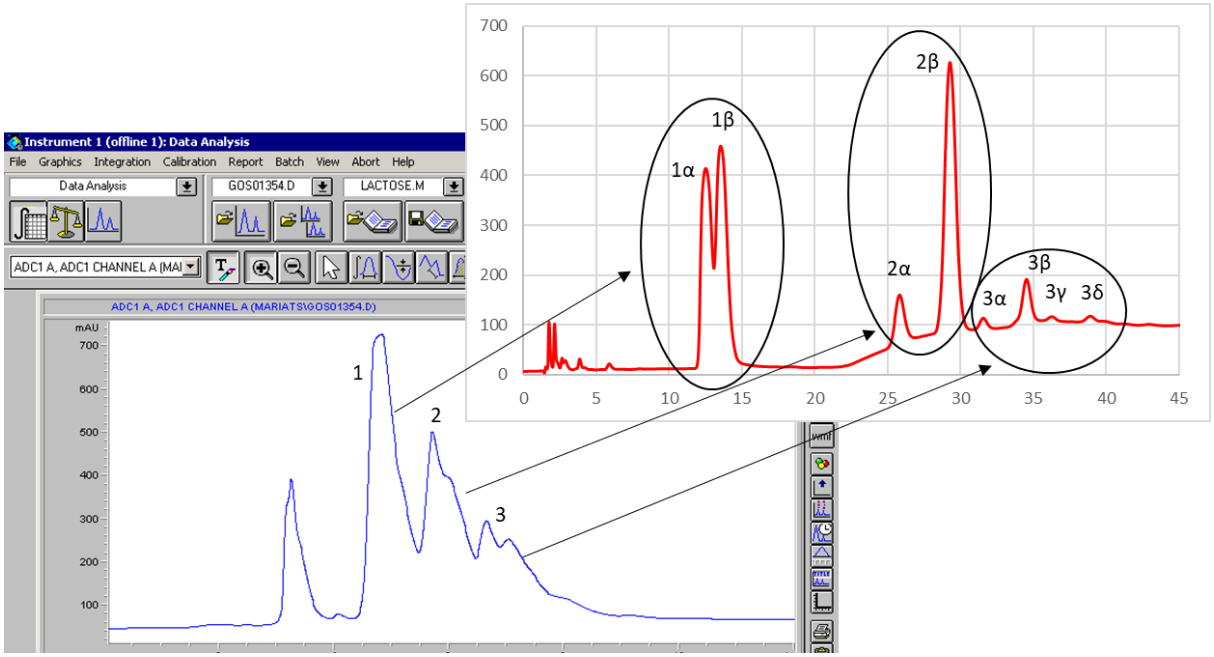
Με σκοπό να μελετηθεί η επίδραση του pH της αντίδρασης στην απόδοση της αντίδρασης σε GOS, επιλέχθηκε η ανάλυση ενός δείγματος στο χρόνο μέγιστης απόδοσης που πραγματοποιήθηκε σε διαφορετικό pH από το βέλτιστο. Έτσι, επιλέχθηκε η ανάλυση του δείγματος που λήφθηκε σε χρόνο 360 min, σε υπόστρωμα ορού 3,5% κ.ό. συγκέντρωσης λακτόζης με ένζυμο ενεργότητας 0,052 U/mL, σε τιμή pH 5,5 και θερμοκρασία αντίδρασης 37°C. Το δείγμα που λήφθηκε στον παραπάνω χρόνο οδηγήθηκε προς ανάλυση στα συστήματα HPLC και HPAEC-PAC, των οποίων τα χρωματογραφήματα παρουσιάζονται συγκριτικά παρακάτω.



Εικόνα 5.3. *Συγκριτικά χρωματογραφήματα HPLC και HPAEC-PAC από την ενζυμική αντίδραση σε υπόστρωμα ορού 3,5% κ.ό. συγκέντρωσης λακτόζης με ένζυμο β-γαλακτοζιδάσης ενζυμικής ενεργότητας 0,052U/mL, σε τιμή pH 5,5 και θερμοκρασία αντίδρασης 37°C*

Όσον αφορά στην παραγωγή GOS, από την Εικόνα 5.3 παρατηρείται ότι η κορυφή των ολιγοσακχαριτών έχει μικρότερο εμβαδόν (κορυφή 3), υποδηλώνοντας έτσι και μικρότερη απόδοση μετατροπής σε GOS, ενώ η κορυφή των μονοσακχαριτών είναι πολύ μεγαλύτερη από εκείνη της Εικόνας 5.2, εμφανίζοντας πιθανότατα την τάση του ενζύμου να δρα προς υδρόλυση και όχι προς τρανσγαλακτοζυλίωση σε αυτές τις τιμές pH. Τέλος, με την ανάλυση του δείγματος στο σύστημα της HPAEC-PAD παρατηρήθηκε ότι παράγονται οι ίδιοι μονοσακχαρίτες και δισακχαρίτες, όπως και προηγουμένως, ενώ χαρακτηριστική είναι η παραγωγή τριών διαφορετικών τρισακχαριτών (κορυφές 3α-3γ) σε σχέση με το προηγούμενο δείγμα που εμφάνιζε 4 κορυφές. Δεν υπάρχουν βιβλιογραφικές πηγές που να επιβεβαιώνουν εάν μια τέτοια διαφορά οφείλεται στη μείωση του υποστρώματος της λακτόζης ή στο διαφορετικό pH του υποστρώματος, παρόλα αυτά αναφέρεται ως παρατήρηση.

Κατά τη μελέτη της επίδρασης της θερμοκρασίας της αντίδρασης στην απόδοση της μελετώμενης ενζυμικής αντίδρασης, επιλέχθηκε η ανάλυση ενός δείγματος στο χρόνο μέγιστης απόδοσης που πραγματοποιήθηκε σε διαφορετική θερμοκρασία από τη βέλτιστη. Έτσι, αναλύθηκε το δείγμα που παραλήφθηκε σε χρόνο 45 min, της ενζυμικής αντίδρασης που πραγματοποιήθηκε στις συνθήκες περιεκτικότητας του υποστρώματος σε λακτόζη 14% κ.ό., με ένζυμο ενεργότητας 0,052 U/mL, σε τιμή pH υποστρώματος 7,0 και θερμοκρασία αντίδρασης 45°C. Το δείγμα που λήφθηκε στον παραπάνω χρόνο οδηγήθηκε προς ανάλυση στα συστήματα HPLC και HPAEC-PAC, των οποίων τα χρωματογραφήματα παρουσιάζονται συγκριτικά παρακάτω.

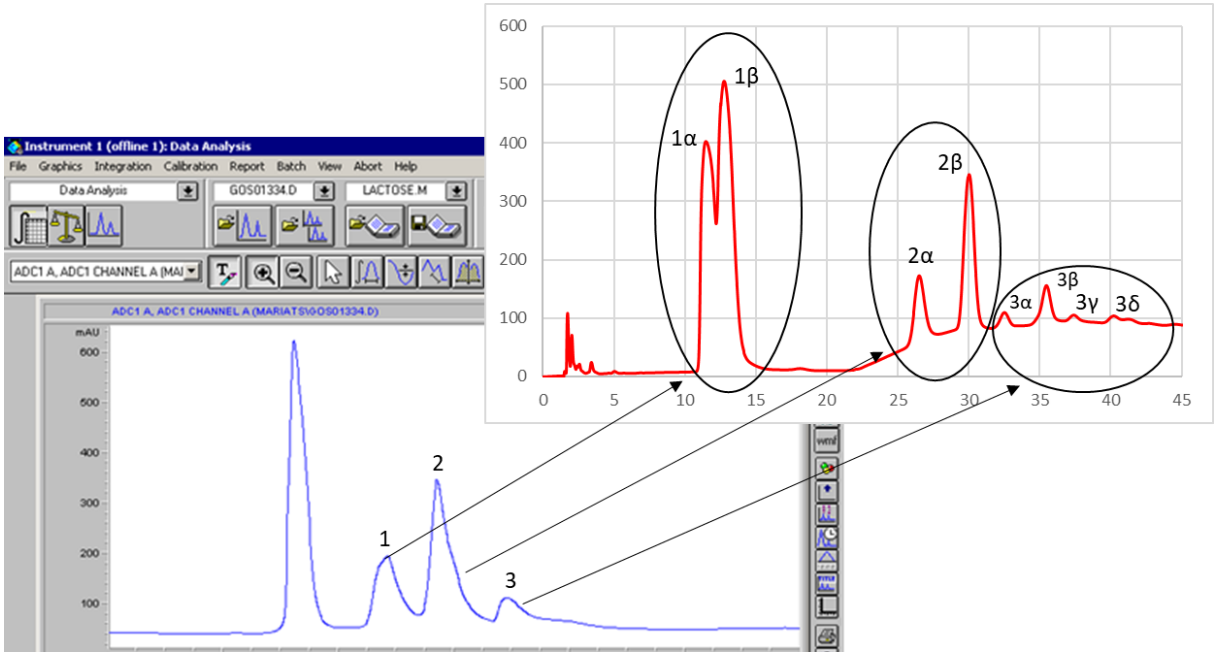


Εικόνα 5.4. *Συγκριτικά χρωματογραφήματα HPLC και HPAEC-PAC από την ενζυμική αντίδραση σε υπόστρωμα ορού 14% κ.ό. συγκέντρωσης λακτόζης με ένζυμο β-γαλακτοζιδάσης ενζυμικής ενεργότητας 0,052U/mL, σε τιμή pH 7 και θερμοκρασία αντίδρασης 45°C*

Στο παραπάνω χρωματογράφημα που παραλήφθηκε από το σύστημα HPLC, αποτυπώνεται η μη ικανότητα του συστήματος να διαχωρίσει τα σχηματιζόμενα σάκχαρα, κάτι το οποίο είναι εφικτό στο σύστημα HPAEC-PAD, όπως φαίνεται και στο δεξί χρωματογράφημα. Όσον αφορά στην ποιοτική ανάλυση των δειγμάτων στο σύστημα HPAEC-PAD, παρατηρείται όμοια σύσταση του δείγματος με εκείνη που παραλήφθηκε κατά την πραγματοποίηση της αντίδρασης στις βέλτιστες συνθήκες (Εικόνα 5.2).

Τέλος, κατά τη μελέτη της επίδρασης των συστατικών του υποστρώματος στην απόδοση της ενζυμικής αντίδρασης, επιλέχθηκε η ανάλυση ενός δείγματος στο χρόνο μέγιστης απόδοσης που πραγματοποιήθηκε σε διαφορετικό υπόστρωμα από εκείνο του όξινου ορού. Έτσι, αναλύθηκε το δείγμα που παραλήφθηκε σε χρόνο 240 min, της ενζυμικής αντίδρασης που πραγματοποιήθηκε σε όξινο ορό χωρίς πρωτεΐνες, σε υπόστρωμα 14% κ.ό. συγκέντρωσης λακτόζης με ένζυμο ενεργότητας 0,052 U/mL, σε τιμή pH 7 και θερμοκρασία αντίδρασης 37°C. Το δείγμα που λήφθηκε στον παραπάνω χρόνο οδηγήθηκε προς ανάλυση στα συστήματα HPLC και HPAEC-PAC, των οποίων τα χρωματογραφήματα παρουσιάζονται συγκριτικά παρακάτω (Εικόνα 5.5).

Από την ανάλυση του χρωματογραφήματος προκύπτει ότι στο δείγμα αυτό περιέχονται παρόμοια σάκχαρα αλλά με αρκετά διαφορετικές συγκεντρώσεις από αυτά που προέκυψαν από την ανάλυση του δείγματος στις βέλτιστες συνθήκες της ενζυμικής αντίδρασης (Εικόνα 5.2).



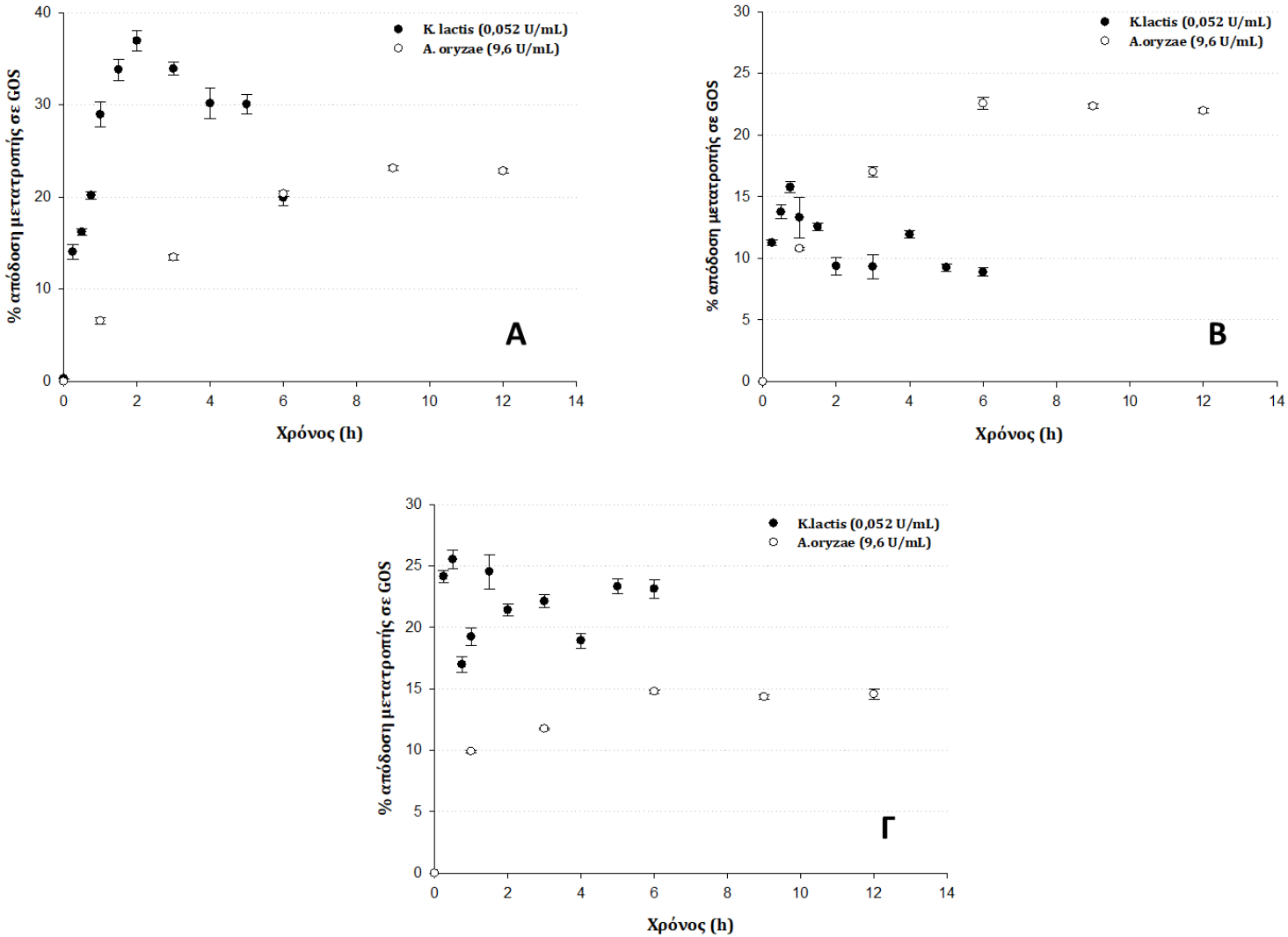
Εικόνα 5.5. *Συγκριτικά χρωματογραφήματα HPLC και HPAEC-PAC από την ενζυμική αντίδραση σε υπόστρωμα ορού που δεν περιέχει πρωτεΐνες 14% κ.ό. συγκέντρωσης λακτόζης με ένζυμο β-γαλακτοζιδάσης ενζυμικής ενεργότητας 0,052U/mL, σε τιμή pH 7 και θερμοκρασία αντίδρασης 37°C*

5.4 Συγκριτικά αποτελέσματα της ενζυμικής αντίδρασης με ένζυμο β-γαλακτοζιδάσης από *K.lactis* σε σύγκριση με τον *A. oryzae*

Όπως έγινε σαφές από τα παραπάνω αποτελέσματα, είναι εφικτή η αξιοποίηση της λακτόζης που περιέχεται στον όξινο ορό, για την μετατροπή της σε GOS, μέσω ενζυμικής αντίδρασης με χρήση της β-γαλακτοζιδάσης από το ζυμομύκητα *K. lactis*. Από προγενέστερη έρευνα, έχει μελετηθεί η αντίστοιχη αξιοποίηση της λακτόζης του όξινου ορού, χρησιμοποιώντας β-γαλακτοζιδάση από τον ευρωτομύκητα *A. oryzae* (Γαλάνη, 2016). Σκόπιμο, λοιπόν, κρίθηκε να πραγματοποιηθεί σύγκριση των αποτελεσμάτων που προέκυψαν από την παρούσα μελέτη με εκείνα για την β-γαλακτοζιδάση από τον *A. oryzae*, στις βέλτιστες συνθήκες.

Οι βέλτιστες συνθήκες της ενζυμικής αντίδρασης με χρήση β-γαλακτοζιδάσης από τον μικροοργανισμό *K. lactis* για την επίτευξη του μέγιστου βαθμού απόδοσης σε GOS ήταν υπόστρωμα όξινου ορού περιεκτικότητας 14% κ.ό. σε λακτόζη, θερμοκρασία 37°C και ενεργότητα ενζύμου ίση με 0,052 U/mL. Αντίστοιχα, οι βέλτιστες συνθήκες της ενζυμικής αντίδρασης με χρήση β-γαλακτοζιδάσης από τον μικροοργανισμό *A. oryzae* ήταν όξινος ορός με περιεκτικότητα 14% κ.ό. σε λακτόζη, θερμοκρασία 40°C και ενεργότητα ενζύμου ίση με 9,6 U/mL (Γαλάνη, 2016).

Τόσο η αντίδραση με το ένζυμο της β-γαλακτοζιδάσης από τον *K. lactis*, όσο και από τον *A. oryzae* πραγματοποιήθηκαν σε υπόστρωμα όξινου ορού 14% κ.ό. περιεκτικότητας σε λακτόζη και σε θερμοκρασίες 37-40, 45 και 50^0 C, προκειμένου να αναζητηθούν οι βέλτιστες συνθήκες της αντίδρασης. Παρακάτω, παρουσιάζονται τα αντίστοιχα συγκριτικά διαγράμματα της συγκέντρωσης μονοσακχαριτών και δισακχαριτών, καθώς και του βαθμού απόδοσης σε GOS συναρτήσει του χρόνου στο αντιδρών μίγμα (Διαγράμματα 5.35 Α-Γ).



Διάγραμμα 5.35. *Συγκριτικό διάγραμμα της απόδοσης μετατροπής σαν συνάρτηση του χρόνου αντίδρασης με χρήση β-γαλακτοζιδάσης από K.lactis και A.oryzae σε θερμοκρασία 37°C (Α), 45°C (Β) και 55°C (Γ)*

Από τη μορφή των παραπάνω διαγραμμάτων, φαίνεται ότι η απόδοσης της ενζυμικής αντίδρασης σε GOS είναι διαφορετική για τις διαφορετικής προέλευσης β-γαλακτοζιδάσες που χρησιμοποιήθηκαν. Σε κάθε μία από τις μελετώμενες θερμοκρασίες παρατηρείται ότι ο βαθμός απόδοσης σε GOS με χρήση β-γαλακτοζιδάσης από *K. lactis* έχει τη μορφή καμπύλης που εμφανίζει μέγιστο και στη συνέχεια φθίνει. Από την άλλη, η καμπύλη του βαθμού απόδοσης σε GOS στην περίπτωση χρήσης β-γαλακτοζιδάσης από *A. oryzae* φαίνεται να εμφανίζει πλατό, γεγονός που υποδηλώνει ότι η β-γαλακτοζιδάση από τον *K. lactis* υδρολύει τα παραγόμενα προϊόντα για μεγάλους χρόνους ενζυμικής αντίδρασης.

Όσον αφορά στο μέγιστο βαθμό απόδοσης σε GOS, αυτός επιτυγχάνεται στη θερμοκρασία των 37 και 45ºC για το ένζυμο από *K. lactis* και *A. oryzae* αντίστοιχα, στις μελετώμενες ενζυμικές ενεργότητες (0,052 και 9,6 U/mL, αντίστοιχα) και τιμές pH υποστρώματος (7,0 και 4,5, αντίστοιχα). Στις συνθήκες αυτές ο μέγιστος βαθμός απόδοσης σε GOS είναι 37,0±1,06 % και 23,1±0,25 % για την περίπτωση του *K. lactis* και *A. oryzae,* αντίστοιχα. Στον Πίνακα 5.8 παρουσιάζονται συγκριτικά οι μέγιστοι βαθμοί απόδοσης σε GOS με τους αντίστοιχους χρόνους επίτευξής τους, για τις δύο διαφορετικής προέλευσης β-γαλακτοζιδάσες σε κάθε μία από τις μελετώμενες συνθήκες της αντίδρασης.

Πίνακας 5.8. *Συγκριτικός πίνακας των μεγίστων αποδόσεων σε GOS και των αντίστοιχων χρόνων επίτευξής τους, με χρήση β-γαλακτοζιδάσης από K.lactis και A.oryzae σε θερμοκρασίες 37,45 και 55ºC*

Προέλευση ενζύμου βγαλακτοζιδάσης	**Δραστικότητα ενζύμου (U/mL)**	**Τιμή pH υποστρώματος όξινου ορού**	**Θερμοκρασία αντίδρασης (ºC)**	**Μέγιστη % απόδοση σε GOS**	**Χρόνος επίτευξης (min)**
K. lactis	0,052	7,0	37	37,0±1,06	120
			45	15,8±0,45	45
			55	25,5±0,77	90
A. oryzae	9,6	4,5	40	22,6±0,50	540
			45	23,1±0,25	360
			55	14,8±0,15	360

Γενικά, όσον αφορά στην προέλευση της β-γαλακτοζιδάσης, τα πλεονεκτήματα της χρήσης του ενζύμου από τον *K. lactis* έναντι του *A. oryzae* είναι τα εξής:

- ✓ Επιτυγχάνεται μεγαλύτερος μέγιστος βαθμός απόδοσης σε GOS κατά 15 ποσοστιαίες μονάδες (60% αύξηση).
- ✓ Η μέγιστη απόδοση σε GOS επιτυγχάνεται σε χρόνο μικρότερο κατά 4 ώρες.
- ✓ Απαιτείται πολύ χαμηλότερη ενεργότητα ενζύμου για την επίτευξη της μέγιστης απόδοσης σε GOS.

Από την άλλη, τα πλεονεκήματα της χρήσης του ενζύμου από τον *A. oryzae* έναντι του *K. lactis* συνοψίζονται στα παρακάτω:

- ✓ Η β-γαλακτοζιδάση από *A. oryzae* δρα βέλτιστα σε τιμή pH ίση με 4,0, παρόμοια με αυτήν του όξινου ορού, επομένως μπορεί να χρησιμοποιηθεί απευθείας σε αυτόν. Από την άλλη, η β-γαλακτοζιδάση από *K. lactis* δρα βέλτιστα σε pH 7,0, οπότε όταν το υπόστρωμα είναι όξινος ορός θα πρέπει να προηγείται ρύθμιση του pH του υποστρώματος, που οδηγεί σε απώλεια μέρους της περιεχόμενης λακτόζης λόγω καταβύθισης, όπως παρατηρήθηκε στην παρούσα μελέτη.

- ✓ Με τη χρήση της β-γαλακτοζιδάσης από *A. oryzae* ο μέγιστος βαθμός απόδοσης σε GOS επιτυγχάνεται μεν σε μεγαλύτερο χρόνο, και στη συνέχεια η συγκέντρωση των παραγόμενων GOS παραμένει σταθερή. Αντιθέτως, με τη χρήση της β-γαλακτοζιδάσης από τον *K. lactis* η απόδοση σε GOS φτάνει σε ένα μέγιστο και κατόπιν φθίνει, γεγονός που υποδεικνύει την περαιτέρω υδρόλυση των σχηματιζόμενων προϊόντων, και επομένως την ανάγκη για παραλαβή του δείγματος σε συγκεκριμένα χρονικές στιγμές (μεγιστοποίηση της συγκέντρωσης των GOS).

Συμπερασματικά, τόσο η χρήση β-γαλακτοζιδάσης από τον μικροοργανισμό *K. lactis*, όσο από τον *A. oryzae* εμφανίζουν κάποια πλεονεκτήματα και κάποια μειονεκτήματα στη χρήση τους. Για την επίτευξη μεγάλων βαθμών απόδοσης σε GOS με χρήση μικρής ενεργότητας ενζύμου είναι το ζητούμενο της ενζυμικής αντίδρασης που εφαρμόζεται, τότε προτείνεται η επιλογή χρήσης της β-γαλακτοζιδάσης από *K. lactis*. Παρόλα αυτά, λόγω της πολυπλοκότητας στην παραγωγή και κυρίως απομόνωση του εν λόγω ενζύμου (ενδοκυτταρική παραγωγή) η οποία πιθανόν να οδηγεί σε αύξηση της εμπορικής του τιμής, η χρήση β-γαλακτοζιδάσης από *A. oryzae* θα μπορούσε επίσης να χρησιμοποιηθεί, με τα πρόσθετα πλεονεκτήματα της εφαρμογής του ενζύμου απευθείας στον ορό χωρίς ρύθμιση της τιμής του pH, καθώς και τον ευκολότερο έλεγχο της ενζυμικής διεργασίας, λόγω απουσίας φαινομένων υδρόλυσης των παραγόμενων προϊόντων της αντίδρασης.

Συμπεράσματα

Συμπερασματικά, όπως προκύπτει από τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας, η β-γαλακτοζιδάση από τον μικροοργανισμό *Kluyveromyces lactis* φαίνεται να αποτελεί ένα σημαντικό βιοτεχνολογικό εργαλείο, κατά την αξιοποίηση του όξινου ορού προς παραγωγή γαλακτοολιγοσακχαριτών (GOS), με στόχο το σχεδιασμό μιας βιώσιμης βιοδιεργασίας. Η παραπάνω ενζυμική διεργασία φάνηκε να εξαρτάται από μια σειρά παραμέτρων, όπως η περιεκτικότητα του όξινου ορού σε λακτόζη, η ενεργότητα της β-γαλακτοζιδάσης, η θερμοκρασία της αντίδρασης, η τιμή pH του υποστρώματος, καθώς και τα άλλα συστατικά, πλην της λακτόζης, που περιέχονται στον ορό.

Πιο συγκεκριμένα, αναφορικά με την επίδραση της περιεκτικότητας του όξινου ορού σε λακτόζη στον βαθμό απόδοσης της ενζυμικής διεργασίας σε GOS, υπό σταθερές συνθήκες ενζυμικής ενεργότητας, θερμοκρασίας και τιμής pH, παρατηρήθηκε ότι ο μέγιστος βαθμός απόδοσης σε GOS επιτυγχάνεται με χρήση ενζυμικής ενεργότητας β-γαλακτοζιδάσης ίση με 0,052 U/mL, για τιμή περιεκτικότητας του υποστρώματος σε λακτόζη 9%, 14% και 17% κ.ό., με μέγιστες αποδόσεις σε GOS 17,5±1,55%, 37,0±1,06% και 13,8±0,81% αντίστοιχα). Πιο συγκεκριμένα, με αύξηση της περιεκτικότητας του υποστρώματος σε λακτόζη, έως 14 % κ.ό., ο βαθμός απόδοσης της ενζυμικής μετατροπής της λακτόζης σε GOS αυξάνεται, παρουσιάζοντας μέγιστη τιμή ίση με 37,0±1,06% για περιεκτικότητα υποστρώματος σε λακτόζη 14 % κ.ό., με ενζυμική ενεργότητα 0,052 U/mL, τιμή pH του υποστρώματος 7,0 και θερμοκρασία αντίδρασης 37°C, έπειτα από 120 min αντίδρασης. Ωστόσο, για υψηλότερη περιεκτικότητα υποστρώματος σε λακτόζη (17 % κ.ό.) παρατηρήθηκε ελάττωση του μέγιστου βαθμού απόδοσης (13,8±0,81%), υποδηλώνοντας ότι περαιτέρω αύξηση της συγκέντρωσης λακτόζης στο υπόστρωμα ευνοεί αντιδράσεις υδρόλυσης της λακτόζης, έναντι των αντιδράσεων τρανσγαλακτοζυλίωσης. Τέλος, παρατηρήθηκε ότι για υψηλές τιμές περιεκτικότητας του υποστρώματος σε λακτόζη, έπειτα από κάποιο χρόνο αντίδρασης, ο βαθμός απόδοσης σε GOS παρουσίαζε μείωση, αφού λάμβανε μια μέγιστη τιμή. Το γεγονός αυτό υποδηλώνει ότι για υψηλές συγκεντρώσεις GOS ευνοείται η αντίδραση υδρόλυσης των σχηματιζόμενων προϊόντων της ενζυμικής διεργασίας, όπως έχει παρατηρηθεί και από προηγούμενες έρευνες (Torres et al. 2010). Συνεπώς, η ρύθμιση της περιεκτικότητας του όξινου ορού σε λακτόζη στην βέλτιστη τιμή ως προς τον βαθμό απόδοσης της ενζυμικής διεργασίας ολιγομερισμού της λακτόζης σε GOS αποτελεί παράγοντα-κλειδί για την αριστοποίηση της εν λόγω διεργασίας.

Όσον αφορά στην επίδραση της ενεγότητας της β-γαλακτοζιδάσης στο βαθμό απόδοσης της ενζυμικής μετατροπής της λακτόζης του όξινου ορού σε GOS, παρατηρήθηκε ότι αυξανομένης της ενζυμικής ενεργότητας ο μέγιστος βαθμός απόδοσης σε GOS αυξάνεται, με εξαίρεση την τιμή περιεκτικότητας του υποστρώματος σε λακτόζη ίση με 3,5% κ.ό., για την οποία παρατηρήθηκε μέγιστος βαθμός απόδοσης σε GOS για τιμή ενεργόιτητας μικρότερη της μέγιστης που χρησιμοποιήθηκε (0,026 U/mL). Συγκεκριμένα, για περιεκτικότητα υποστρώματος 9% κ.ό. σε λακτόζη, συγκέντρωση στην οποία επιτυγχάνεται η μέγιστη

απόδοση σε GOS, όπως προαναφέρθηκε, για ενεργότητες ενζύμου 0,013, 0,026 και 0,052 U/mL επιτεύχθηκαν μέγιστοι βαθμοί απόδοσης σε GOS 13,5±0,45%, 17,0±1,01% και 17,5±1,55%, αντίστοιχα. Επιπροσθέτως, με αύξηση της ενζυμικής ενεργότητας παρατηρήθηκε αναλογική μείωση του χρόνου επίτευξης του μέγιστου βαθμού απόδοσης σε GOS (180, 120 και 45min, αντίστοιχα, για τις παραπάνω συνθήκες). Έτσι, συμπεραίνεται ότι η επίδραση της ενεργότητας του ενζύμου είναι ένας σημαντικός παράγοντας για τον έλεγχο της απόδοσης των GOS που παράγονται, κάτι το οποίο επιβεβαιώνεται και από προηγούμενες βιβλιογραφικές μελέτες (Gonzalez-Delgado et al. 2016).

Κατά τη μελέτη της επίδρασης της τιμής pH του υποστρώματος στο βαθμό απόδοσης της ενζυμικής αντίδρασης σε GOS, παρατηρήθηκε ότι η μέγιστη απόδοση σε GOS επιτυγχάνεται σε pH υποστρώματος ίσο με 7,0 (23,7±3,05% σε χρόνο 90 min), για περιεκτικότητα όξινου ορού σε λακτόζη 3,5% κ.ό., ενεργότητα ενζύμου 0,026U/mL και θερμοκρασία αντίδρασης 37°C. Το γεγονός αυτό επιβεβαίωσε τη βιβλιογραφικά βέλτιστη τιμή pH δράσης του ενζύμου, αναφορικά με τη μεγιστοποίηση του βαθμού απόδοσης σε GOS (Gonzalez-Delgado et al. 2016). Για τιμή pH υποστρώματος ίση με 5,5, παρατηρήθηκε ότι το ένζυμο δρα εμφανίζοντας μέγιστη απόδοση σε GOS ίση με 10,1±0,50% σε χρόνο 360 min. Έτσι συμπεραίνεται ότι για τιμή pH του υποστρώματος μικρότερη από τη βιβλιογραφικά βέλτιστη (pH=6,8-7,0), συνεπάγεται μείωση της μέγιστης απόδοσης σε GOS, η οποία μικραίνει περαιτέρω, όσο η τιμή pH του υποστρώματος απομακρύνεται από αυτήν. Ειδικότερα, για τιμή pH υποστρώματος ίση με 4,0 παρατηρήθηκε ότι το ένζυμο δεν δύναται να καταλύσει καμία από τις δύο αντιδράσεις (υδρόλυση και τρανσγαλακτοζυλίωση). Συμπερασματικά, η τιμή του υποστρώματος της ενζυμικής αντίδρασης αποτελεί κυρίαρχο παράγοντα αναφορικά με την απόδοση σε GOS, γεγονός που έρχεται σε συμφωνία με τους Gonzalez-Delgado et al. (2016), οι οποίοι έδειξαν ότι η τιμή του pH είναι μία κρίσιμη παράμετρος που επηρεάζει τόσο την απόδοση της τρανσγαλακτοζυλίωσης, όσο και της υδρόλυσης, δεδομένου ότι καθορίζει τη δράση του ενζύμου.

Στη συνέχεια, αναφορικά με την επίδραση της θερμοκρασίας της ενζυμικής αντίδρασης στο βαθμό απόδοσης σε GOS, παρατηρήθηκε ότι, ο μέγιστος βαθμός απόδοσης σε GOS (37,0±1,06% μετά από 120 min) επιτυγχάνεται στους 37°C, για περιεκτικότητα όξινου ορού σε λακτόζη 14% κ.ό., ενεργότητα ενζύμου 0,052 U/mL και τιμή pH υποστρώματος ίση με 7,0, η οποία αποτελεί και τη βιβλιογραφικά βέλτιστη θερμοκρασία δράσης του ενζύμου (Gonzalez-Delgado et al. 2016, Rodriguez-Colinas et al. 2014). Ακόμη, δεδομένου ότι η τελική συγκέντρωση μονοσακχαριτών βρέθηκε ίση προς 10,1±0,42%, 12,9±0,45% και 3,51±0,1% κ.ό. για τους 37, 45 και 55°C, συμπεραίνεται ότι με αύξηση της θερμοκρασίας το ένζυμο τείνει να καταλύει περισσότερο αντιδράσεις υδρόλυσης παρά ολιγομερισμού.

Τέλος, σχετικά με την επίδραση των άλλων συστατικών του ορού, πέρα από τη λακτόζη (πρωτεΐνες και άλατα), στην απόδοση της αντίδρασης σε GOS, παρατηρήθηκε ότι η παρουσία πρωτεϊνών και αλάτων δεν έχει αρνητική επίδραση στο βαθμό απόδοσης σε GOS. Αντιθέτως, από τα αποτελέσματα συμπεραίνεται ότι η παρουσία πρωτεϊνών και αλάτων στο υπόστρωμα της ενζυμικής αντίδρασης πιθανώς ενισχύει τη δραστικότητα του ενζύμου ως προς την κατάλυση αντιδράσεων τρανσγαλακτοζυλίωσης (37,0±1,06%, 18,7±0,88% και 27,2±0,82% για ανεπεξέργαστο ορό, ορό χωρίς πρωτεΐνες και πρότυπο διάλυμα λακτόζης ως υπόστρωμα,

αντίστοιχα). Βιβλιογραφικά επιβεβαιώνεται η θετική επίδραση της παρουσίας αλάτων στο υπόστρωμα αναφορικά με την απόδοση της ενζυμικής μετατροπής της λακτόζης σε GOS (Fischer & Kleinschmidt 2015). Από την άλλη, δεν υπάρχει αναφορά στη βιβλιογραφία σχετικά με την επίδραση της παρουσίας πρωτεϊνών στο υπόστρωμα της ενζυμικής αντίδρασης, η οποία χρήζει περαιτέρω μελέτης.

Συνοψίζοντας, συμπεραίνεται ότι οι βέλτιστες συνθήκες της ενζυμικής αντίδρασης μετατροπής της λακτόζης που περιέχεται στον όξινο ορό σε GOS από τη β-γαλακτοζιδάση από τον *K. lactis*, για τις συνθήκες που μελετήθηκαν στην παρούσα διπλωματική εργασία, επιτυγχάνονται σε υπόστρωμα όξινου ορού περιεκτικότητας 14% κ.ό. σε λακτόζη, με ενζυμική ενεργότητα 0,052 U/mL, σε θερμοκρασία 37°C και τιμή υποστρώματος ίση με pH 7, με μέγιστη απόδοση σε GOS ίση με 37,0±1,06% έπειτα από 120 min αντίδρασης.

Όσον αφορά στην ταυτοποίηση των επιμέρους GOS που παράγονται από την ενζυμική αντίδραση μετατροπής της λακτόζης του όξινου ορού από τη β-γαλακτοζιδάση από τον *K.lactis* έγινε μια πρώτη προσέγγιση μέσω του συστήματος HPAEC-PAD. Για κάθε ένα από τα μελετώμενα δείγματα επιβεβαιώθηκε η ύπαρξη γαλακτόζης και γλυκόζης ως μονοσακχαρίτες με βάση τους χρόνους έκλουσης πρότυπων διαλυμάτων, ενώ με βάση τους χρόνους έκλουσης της λακτόζης, ραφινόζης και σταχυόζης, σε συνδυασμό με αντίστοιχες βιβλιογραφικές αναφορές, ταυτοποιήθηκε η ύπαρξη της 6-γαλακτοβιόζης ως άλλος παραγόμενος δισακχαρίτης, πλην της λακτόζης, ενώ παρατηρήθηκε η ύπαρξη ακόμα τριών έως τεσσάρων αγνώστων ενώσεων που αντιστοιχούν σε ολιγοσακχαρίτες με βαθμό πολυμερισμού 2 ή 3, βάση της βιβλιογραφίας (Rodriguez-Colinas et al. 2014, Urrutia et al. 2013).

Κλείνοντας την παρούσα διπλωματική εργασία και προκειμένου να πραγματοποιηθεί μία πιο ολοκληρωμένη αξιολόγηση των αποτελεσμάτων της ενζυμικής διεργασίας παραγωγής GOS από τη β-γαλακτοζιδάση από *K. lactis*, πραγματοποιήθηκε σύγκριση των αποτελεσμάτων με αντίστοιχα από προηγούμενη μελέτη, που αφορούσαν στην ενζυμική μετατροπή της λακτόζης του όξινου ορού σε GOS με χρήση β-γαλακτοζιδάσης από τον *Aspergillus oryzae*, σε αντίστοιχες συνθήκες (Γαλάνη 2016). Αρχικά, παρατηρήθηκε ότι η προέλευση του ενζύμου επηρεάζει έντονα το βαθμό απόδοσης σε GOS, και μάλιστα με χρήση του ενζύμου από τον *K. lactis* επιτυγχάνεται αύξηση του μέγιστου βαθμού απόδοσης σε GOS κατά 15 ποσοστιαίες μονάδες (60% αύξηση), κάτι που παρατηρήθηκε και από τους Rodriguez-Colinas et al. (2014). Παράλληλα, διαπιστώθηκε μείωση του απαιτούμενου χρόνου επίτευξης του μέγιστου βαθμού απόδοσης σε GOS κατά 4 ώρες, ενώ ταυτόχρονα απαιτείται χαμηλότερη ενεργότητα β-γαλακτοζιδάσης από *K. lactis* για την επίτευξη της μέγιστης απόδοσης σε GOS, σε σύγκριση με εκείνη από *A. oryzae*.

Συμπερασματικά, η β-γαλακτοζιδάση από τον *K. lactis* παρουσιάζει σημαντικές προοπτικές ως προς τη βιομηχανική αξιοποίησή της για τη μετατροπή της περιεχόμενης λακτόζης του όξινου ορού προς παραγωγή συστατικών υψηλής διατροφικής αξίας, όπως οι γαλακτοολιγοσακχαρίτες, με αρκετά υψηλούς βαθμούς απόδοσης σε GOS (37,0±1,06%), στις βέλτιστες συνθήκες, όπως φάνηκε από τα αποτελέσματα της παρούσας διπλωματικής εργασίας. Έτσι, η βιομηχανική εφαρμογή της βιοδιεργασίας παραγωγής GOS αξιοποιώντας την λακτόζη του όξινου ορού κρίνεται βιώσιμη, δεδομένων των ιδιαίτερων χαρακτηριστικών του όξινου ορού και του κόστους που αυτά συνεπάγονται για μια γαλακτοβιομηχανία.

Ο όξινος ορός, ως παραπροϊόν μη διαχειρήσιμο στο βιολογικό καθαρισμό του εργοστασίου, επεξεργάζεται θερμικά και διατίθεται σε κτηνοτροφικές μονάδες για χρήση ως ζωοτροφή. Η διαδικασία αυτή επιφέρει σημαντικά κόστη διαχείρισης σε κάθε βιομηχανία παραγωγής στραγγιστού γιαουρτιού, που εκτιμάται ότι θα αυξηθουν κατακόρυφα την επόμενη διετία. Το κόστος των παραγόμενων προϊόντων είναι υψηλό, και εν μέσω πιέσεων ανταγωνιστικού περιβάλλοντος με γιαούρτια απλοποιημένης παραγωγικής διαδικασίας, γίνεται κατανοητό ότι θα πρέπει να γίνουν προσπάθειες να διατηρηθεί η τεχνολογία στράγγισης που χαρακτηρίζει μία ολόκληρη κατηγορία προϊόντων μέσω καινοτομιών ικανών να διαμορφώσουν ανταγωνιστικά κόστη παραγωγής. Δεδομένων των φυσικοχημικών χαρακτηριστικών του όξινου ορού, η αξιοποίησή του για παραγωγή συστατικών υψηλής αξίας εκτιμάται ως υποσχόμενη για την επίλυση των παραπάνω προβλημάτων.

Η παραγωγή των GOS, συστατικών που στην αγορά λόγω της αυξανόμενης ζήτησης των τελευταίων χρόνων σε συνδυασμό με την περιορισμένη προσφορά παραγωγών σε παγκόσμιο επίπεδο έχουν τιμή αγοράς άνω των 4,5 €/kg, αποκτά οικονομικό ενδιαφέρον για τις γαλακτοβιομηχανίες που παράγουν στραγγιστό γιαούρτι κι έχουν διαθέσιμο όξινο ορό προς αξιοποίηση. Μια γαλακτοβιομηχανία που παράγει στραγγιστό γιαούρτι δύναται να χρησιμοποιήσει τον όξινο ορό της δικής της παραγωγικής γραμμής, αλλά και τον όξινο ορό από άλλες μικρότερες βιομηχανικές μονάδες, αυξάνοντας έτσι τη δυναμικότητα μιας βιομηχανικής γραμμής επεξεργασίας ορού στραγγιστού γιαουρτιού. Τα παραγόμενα συστατικά θα μπορούν να αξιοποιηθούν εμπορικά στην παγκόσμια αγορά, ακολουθώντας την παγκόσμια τάση αύξησης των αναγκαίων ποσοτήτων τους. Επιπρόσθετα, η γαλακτοβιομηχανία θα μπορούσε να αξιοποιήσει τα παραγόμενα συστατικά στις ήδη παραγόμενες σειρές προϊόντων ή/και να αξιολογήσει τον σχεδιασμό νέων προϊόντων άλλων κατηγοριών με ενσωμάτωση των παραγόμενων συστατικών.

Συμπερασματικά, η εφικτή μείωση του συνολικού κόστους παραγωγής του στραγγιστού γιαουρτιού, συμπεριλαμβανομένου του κόστους διαχείρισης των αποβλήτων, τα οποία μετατρέπονται σε πολύτιμη πρώτη ύλη, μέσα από καινοτόμες λύσεις δύναται να οδηγήσει σε οικονομική αξιοποίηση με τρόπο ώστε τα ελληνικά στραγγιστά γιαούρτια να είναι ανταγωνιστικά στην διεθνή αγορά και να οδηγήσουν σε υγιή ανάπτυξη της ελληνικής γαλακτοβιομηχανίας.

Προτάσεις για μελλοντική έρευνα

Ως συνέχεια της παρούσας έρευνας, σκόπιμη κρίνεται η περαιτέρω ανάλυση των προϊόντων που παράγονται από την ενζυμική αντίδραση της μετατροπής της λακτόζης του όξινου ορού σε GOS, μέσω του συστήματος HPAEC-PAD, προκειμένου για την ολοκληρωμένη ταυτοποίηση και ποσοτικοποίηση αυτών, με τη χρήση διαλυμάτων πρότυπων σακχάρων.

Ακόμη, δεδομένου ότι παρατηρήθηκε θετική επίδραση των πρωτεϊνών του ορού στο σύστημα της ενζυμικής αντίδρασης, και δεδομένου ότι δεν υπάρχουν βιβλιογραφικές αναφορές που να καλύπτουν το παραπάνω θέμα, κρίνεται απαραίτητη η περαιτέρω διερεύνηση της επίδρασης της παρουσίας πρωτεϊνών στην απόδοση της ενζυμικής μετατροπής της λακτόζης σε GOS.

Παράλληλα ενδιαφέρουσα κρίνεται η μελέτη της χρήσης γλυκού ορού ως υπόστρωμα για την πραγματοποίηση της μελετώμενης ενζυμικής αντίδρασης, με χρήση β-γαλακτοζιδάσης τόσο

από *K. lactis* όσο και από *A. oryzae* και η συγκριτική μελέτη και αριστοποίηση της διεργασίας αναφορικά με το βαθμό απόδοσης σε GOS.

Ακόμη, καθώς προέκυψε ότι η ενζυμική διεργασία είναι πιο αποδοτική σε συμπυκνωμένο υπόστρωμα όξινου ορού, σκόπιμη κρίνεται η μελέτη της πραγματοποίησης της ενζυμικής αντίδρασης ταυτόχρονα με τη συμπύκνωση και η αριστοποίηση αυτής της διεργασίας. Σε αυτό το πλαίσιο, θα πρέπει να μελετηθεί διεξοδικά το φαινόμενο της κρυστάλλωσης της λακτόζης, καθώς και ο καθορισμός των θερμοφυσικών και ρεολογικών χαρακτηριστικών της. Το φαινόμενο της κρυστάλλωσης επηρεάζει αρνητικά την προσπάθεια αριστοποίησης της παραπάνω διεργασίας και θα πρέπει να μελετηθούν οι κατάλληλες συνθήκες που θα υπερνικήσουν αυτό το εμπόδιο.

Ένα ακόμη πεδίο έρευνας αποτελεί εκείνο της παραγωγής και του χαρακτηρισμού καινοτόμων λακτασών, με στόχο την ανάπτυξη βιοκαταλυτών με επιθυμητές για τη μελετώμενη ενζυμική διεργασία ιδιότητες, όπως η αυξημένη θερμοσταθερότητα (>50-55°C) και η αποδοτικότητα σε όξινες τιμές pH (4,2-5,6).

Τέλος, κρίνεται σκόπιμη η διερεύνηση της δυνατότητας αξιοποίησης του όξινου ορού σε βιομηχανική κλίμακα, σε συνδυασμό με μία τεχνοοικονομική και μία περιβαλλοντική μελέτη, με στόχο την ελαχιστοποίηση του κόστους των διεργασιών, τη μεγιστοποίηση του κέρδους και τη μείωση του περιβαλλοντικού αποτυπώματος της βιομηχανίας.

Βιβλιογραφία

Albayrak, N., & Yang, S. (2002). Production of galacto-oligosaccharides from lactose by *Aspergillus oryzae* b-galactosidase immobilized on cotton cloth. Biotechnology Bioengineering, 77, 8-19.

Alonso, S., Herrero, M., Rendueles, M., & Dıaz, M. (2010). Residual yoghurt whey for lactic acid production. Biomass and Bioenergy Journal, 34, 931-938.

Ansari, S., & Husain, Q. (2010). Lactose hydrolysis by β-galactosidase immobilized on concanavalin: A-cellulose in batch and continuous mode. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 63, 68-74.

Baccouche, A., Ennouri, M., Felfoul, I., & Attia, H. (2013). A Physical Stability Study of Whey-Based Prickly Pear Beverages. Food Hydrocolloids, 33, 234-244.

Bednarski, W., & Kulikowska, A. (2007). Influence of two-phase system composition on biocatalytic properties of β-galactosidase preparations. Chemical Papers, 61, 364-369.

Bhatnagar, S., & Aggarwal, R. (2007). Lactose intolerance. BMJ Publishing Group, 334, 1331-1332.

Bodalo, A., Gomez, J., Gomez, E., Maximo, M., & Hidalgo, A. (2001). Simulation of transients state in enzymatic membrane reactors for resolution of DL-valine and experimental. Journal of Chemical Technology & Biotechnology, 76, 978-984.

Boon, M., Janssen, A., & van 't Riet, K. (2000). Effect of temperature and enzyme origin on the enzymatic synthesis of oligosaccharides. Enzyme and Microbial Technology, 26, 271-281.

Boutin, R. (2005). Lactose: the forgotten sugar. Kennedy's Confection, vol, 46–47.

Buchholz, K., Kasche, V., & Bornscheuer, U. (2005). Biocatalysts and Enzyme Technology. Weinheim: Wiley-VCH Verlag.

Chiu, C., & Etzel, M. (2006). Fractionation of Lactoperoxidase and Lactoferrin from Bovine Whey Using a Cation Exchange Membrane. Journal of Food Science, 62, 996-1000.

Chockchaisawasdee, S., Athanasopoulos, V., Niranjan, K., & Rastall, R. (2005). Synthesis of galacto-oligosaccharide from lactose using β- galactosidase from *Kluyveromyces lactis*: Studies on batch and continuous UF membrane- fitted bioreactors. Biotechnology and Bioengineering, 89, 434-443.

Chung, C., Yamini, S., & Trumbo, P. (2012). FDA's Health Claim Review: Whey-protein Partially Hydrolyzed Infant Formula and Atopic Dermatitis. Pediatrics, 130, 408-414.

Conick, H. (2015). US Greek yogurt market to reach $4bn by 2019: Technavio. Retrieved October 17, 2018, from www.dairyreporter.com

Cooper, S. (2015). Galacto-Oligosaccharides (GOS) Market Size By Application (Prebiotic Dietary Supplements, Food & Beverage) Competitive Analysis & Forecast, 2012 - 2020. Retrieved December 18, 2108, available online on Hexa research website: https://www.hexaresearch.com/research-report/galacto-oligosaccharides-market

Dam, V., Revallier-Warffemius, J., & Van Dam-Schermerhorn, L. (1950). Preparation of lactase from *Saccharomyces fragilis*. Netherlands Milk and Dairy Journal, 4, 96-114.

Darade, R., & Ghodake, S. (2012). An overview of whey beverages. Research Journal of Animal Husbandry and Dairy Science, 3, 41-43.

Das, R., Sen, D., Sarkar, A., Bhattacharyya, S., & Bhattacharjee, C. (2011). A Comparative Study on the Production of Galacto-oligosaccharide from Whey Permeate in Recycle Membrane Reactor and in Enzymatic Batch Reactor. Industrial & Engineering Chemistry Research, 50, 806-816.

Domingues, L., Lima, N., Teixeira, J.A. (2005). *Aspergillus niger* b-galactosidase production by yeast in a continuous high cell density reactor. Process Biochemistry, 40, 1151–1154.

Dong, Y., Sun, Y., Chen, Y., & Wu, W. (2015). Determination of lactose solubility in organic-aqueous biphasic system. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 15, 262-267.

Erickson, B. (2017). Acid whey: Is the waste product an untapped goldmine? C&EN - Chemical Engineering news, 95, 26-30.

Fischer, C., & Kleinschmidt, T. (2015). Synthesis of galactooligosaccharides using sweet and acid whey as a substrate. International Dairy Journal, 48, 15-22.

Fischer, C., & Kleinschmidt, T. (2018). Combination of two b-galactosidases during the synthesis of galactooligosaccharides may enhance yield and structural diversity. Biochemical and Biophysical Research Communications, 506, 211-215.

Francesconi, C.F., Machado, M.B., Steinwurz, F., Nones, R.B., Quilici, F.A., Catapani, W.R., Miszputen, S.J., Bafutto, M. (2016). Oral administration of exogenous lactase in tablets for patients diagnosed with lactose intolerance due to primary hypoplactasia. Arquivos de Gastroenterologia, 53, 228–234.

Freitas, F., Marquez, L., Ribeiro, G., Brandao, G., Cardoso, V., & Ribeiro, E. (2011). A comparison of the kinetic properties of free and immobilized *Aspergillus oryzae* b-galactosidase. Biochemical Engineering Journal, 58-59, 33-38.

Gaille, B. (2018). 21 Greek Yogurt Industry Statistics and Trends. Retrieved December 24, 2018, from Brand on gaille: https://brandongaille.com/21-greek-yogurt-industry-statistics-and-trends/

Gänzle, M., Haase, G., & Jelen, P. (2008). Lactose: Crystallization, hydrolysis and value-added derivatives. International Dairy Journal, 18, 685-694.

Gaur, R., Pant, H., Jain, R., & Khare, S. (2006). Galacto-oligosaccharide synthesis by immobilized *Aspergillus oryzae* beta-galactosidase. Food Chemistry, 97, 426-430.

Gekas, V., & Lopez-Leiva, M. (1985). Hydrolysis of Lactose: A Literature Review. Process Biochemistry, 20, 2-12.

Gonzalez-Delgado, I., Lopez-Munoz, M.-J., Morales, G., & Segura, Y. (2016). Optimisation of the synthesis of high galacto-oligosaccharides (GOS) from lactose with b-galactosidase from *Kluyveromyces lactis*. International Dairy Journal, 61, 211-219.

Grosová, Z., Rosenberg, M., Gdovin, M., Sláviková, L. (2009). Production of D-galactose using beta-galactosidase and *Saccharomyces cerevisiae* entrapped in poly(vinylalcohol) hydrogel, Food Chemistry, 116, 96-100

Guerrero, C., Vera, C., Acevedo, F., & Illanes, A. (2015). Simultaneous synthesis of mixtures of lactulose and galacto-oligosaccharides and their selective fermentation. Journal of Biotechnology, 209, 31-40.

Guerrero, C., Vera, C., Plou, F., & Illanes, A. (2011). Influence of reaction conditions on the selectivity of the synthesis of lactulose with microbial β-galactosidases. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 72, 206–212.

Guidini, C., Fischer, J., Santana, L., Cardoso, V., & Ribeiro, E. (2010). Immobilization of *Aspergillus oryzae* b-galactosidase in ion exchange resins by combined ionic-binding method and cross-linking. Biochemical Engineering Journal, 52, 137-143.

Guleç, H., Gürdaç, A., Albayrak, N., & Mutlu, M. (2010). Immobilization of Aspergillus oryzae b-galactosidase on low-pressure plasma-modified cellulose acetate membrane using polyethyleneimine for production of galactooligosaccharide. Biotechnology and Bioprocess Engineering, 15, 1006–1015.

Haider, T., & Husain, Q. (2009). Hydrolysis of milk/whey lactose by galactosidase: A comparative study of stirred batch process and packed bed reactor prepared with calcium alginate entrapped enzyme. Chemical Engineering and Processing, 48, 576-580.

Hansson, T., & Adlercreutz, P. (2001). Optimization of galactooligosaccharide production from lactose using beta-glycosidases from hyperthermophiles. Food Biotechnology, 15, 79-97.

Harper, W. (1992). Lactose and Lactose Derivatives. In Zadow W.J., Whey and Lactose Processing. Springer, 317-360.

Hsu, C., Lee, S., & Chou, C. (2007). Enzymatic Production of Galactooligosaccharides by β-Galactosidase from *Bifidobacterium longum* BCRC 15708. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 55, 2225-2230.

Huerta, L., Vera, C., Guerrero, C., Wilson, L., & Illanes, A. (2011). Synthesis of galacto-oligosaccharides at very high lactose concentrations with immobilized b-galactosidases from *Aspergillus oryzae*. Process Biochemistry, 46, 245-252.

Husain, Q., Ansari, S., Alam, F., & Azam, A. (2011). Immobilization of *Aspergillus oryzae* β-galactosidase on zinc oxide nanoparticles via simple adsorption mechanism. International Journal of Biological Macromolecules, 49, 37-43.

Iqbal, S., Nguyen, T., Nguyen, T., Maischberger, T., & Haltrich, D. (2010). β-Galactosidase from *Lactobacillus plantarum* WCFS1: biochemical characterization and formation of prebiotic galacto-oligosaccharides. Carbohydrate Research, 345, 1408-1416.

Irazoqui, G., Giacomini, C., Batista-Viera, F., Brena, B., Cardelle-Cobas, A., Corzo, N., & Jimeno, M. (2009). Characterization of galactosyl derivatives obtained by transgalactosylation of lactose and different polyols using immobilized b-galactosidase from *Aspergillus oryzae*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 57, 11302–11307.

Jain, S., Stanford, N., Bhagwat, N., Seiler, B., Costanzo, M., Boone, C., & Oelkers, P. (2007). Identification of a novel lysophospholipid acyltransferase in *Saccharomyces cerevisiae*. 282, 30562-30569.

Jelen, P. (2003). Whey processing - Utilization and Products. In J. Fuquay, P. McSweeney, & H. Roginski, Encyclopedia of Dairy Sciences (pp. 2739–2745). New York.

Jeličić, I., Božanić, R., & Tratnik, L. (2008). Whey based beverages - new generation of dairy products. Faculty of Food Technology and Biotechnology, 58, 257-274.

Johnson, J., & Conforti, F. (2003). Lactose. In Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition (2 ed., pp. 3472-3476). USA.

Jürgen, S., & Klaus, B. (2010). Tools in Oligosaccharide Synthesis: Current Research and Application. Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry, 63, 101-138.

Kazemi, S., Khayati, G., & Faezi-Ghasemi, M. (2016). β-galactosidase Production by Aspergillus niger ATCC 9142 Using Inexpensive Substrates in Solid-State Fermentation: Optimization by Orthogonal Arrays Design. Iranian Biomedical Journal, 20, 287-294.

Kellam, S. (1998). The Manufacture of lactose. in Chemical Processes in New Zealand.

Kilara, A., & Chandan, R. (2013). Greek-style yogurt and related. In Manufacturing Yogurt and Fermented Milks (Second Edition ed., pp. 297–318).

Kim, Y., Park, C., & Oh, D. (2006). Lactulose production from lactose and fructose by a thermostable b-galactosidase from *Sulfolobus solfataricus*. Enzyme and Microbial Technology, 39, 903-908.

Kosseva, M., Panesar, P., Kaur, G., & Kennedy, J. (2009). Use of immobilised biocatalysts in the processing of cheese whey. International Journal of Biological Macromolecules, 45, 437-447.

Kumari, S., Panesar, P., Bera, M., & Panesar, R. (2013). Permeabilization of a newly isolated *Kluyveromyces* sp. for the preparation of whole cell biocatalysts with β-galactosidase activity. International Journal of food and nutritional sciences, 2, 22-26.

Kyle, C., & Amamcharla, J. (2016). Value Addition of Greek Yogurt Whey Using Magnetic Fluid and Sepiolite Treatments. Food and Bioprocess Technology, 9, 553-563.

Liaw, I., Evan Miracle, R., Jervis, S., Listiyani, M., & Drake, M. (2011). Comparison of the flavor chemistry and flavor stability of mozzarella and cheddar wheys. Journal of food science, 76, 1188-1194.

Ly, H., & Withers, S. (1999). Mutagenesis of Glycosidases. Annual Review of Biochemistry, 68, 487-522.

Macwan, S., Dabhi, B., & Parmar, S. (2016). Whey and its Utilization. International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences, 5, 136-155.

Maida, J. (2017). Global Greek Yogurt Market - Growth Opportunity Analysis | Technavio. Retrieved December 24, 2018, from Business Wire: https://www.businesswire.com/news/home/20170928005688/en/Global-Greek-Yogurt-Market---Growth-Opportunity

Mammarella, E., & Rubiolo, A. (2005). Study of the deactivation of β-galactosidase entrapped in alginate-carrageenan gels. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 34, 7-13.

Martinez-Villaluenga, C., Cardelle-Cobas, A., Corzo, N., Lano, A., & Villamiel, M. (2008). Optimization of conditions for galactooligosaccharide synthesis during lactose hydrolysis by beta-galactosidase from *Kluyveromyces lactis*. Food Chemistry, 107, 258–264.

Matella, N., Dolan, K., & Lee, Y. (2006). Comparison of galactooligosaccharide production in free enzyme ultrafiltration and in immobilized-enzyme systems. Journal of Food Science, 71, 363-368.

Maugard, T., Gaunt, D., Legoy, M., & Besson, T. (2003). Microwave-assisted synthesis of galactooligosaccharides from lactose with immobilized beta-galactosidase from *Kluyveromyces lactis*. Biotechnology Letters, 25, 623–629.

Mawson, A. (1994). Bioconversions for whey utilization and waste abatement. Bioresource Technology, 47, 195-203.

McSweeney, P., & Fox, P. (2009). Lactose, water, salts and vitamins. Advanced dairy chemistry, 3, 759.

Neri, D., Balcão, V., Cardoso, S., Silva, A., Domingues, M., Torres, D., Teixeira, J. (2011). Characterization of galactooligosaccharides produced by β-galactosidase immobilized on to magnetized Dacron. International Dairy Journal, 21, 172-178.

Nishanthi, M., Chandrapala, J., Vasiljevic T. (2017). Compositional and structural properties of whey proteins of sweet, acid and salty whey concentrates and their respective spray dried powders. International Dairy Journal, 74, 49-56.

Norimasa, O., & Tanaka, T. (1996). Purification and properties of a galacto- and gluco-oligosaccharide-producing β-glycosidase from *Rhodotorula minuta* IFO879. Journal of Fermentation and Bioengineering, 82, 439-443.

Otieno, D. (2010). Synthesis of β- Galactooligosaccharides from Lactose Using Microbial β-Galactosidases. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 9, 471-482.

Pal, A., Pal, V., Ramana, K., & Bawa, A. (2009). Biochemical studies of ß-galactosidase from *Kluyveromyces lactis*. Journal of Food Science and Technology, 46, 217-220.

Panesar, P. S., Kaur, R., Kennedy, J. F., & Singh, R. S. (2018). Biocatalytic strategies in the production of galacto-oligosaccharides and its global status. International Journal of Biological Macromolecules, 111, 667-679.

Panesar, P., Kennedy, J., Gandhi, D., & Bunko, K. (2007). Bioutilisation of whey for lactic acid production. Food Chemistry, 105, 1-14.

Panesar, P., Kumari, S., & Panes, R. (2010). Potential Applications of Immobilized β-Galactosidase in Food Processing Industries. Enzyme Research, 2010, 1-16.

Panesar, P., Panesar, R., Singh, R., Kennedy, J., & Kumar, H. (2006). Microbial production, immobilization and applications of b-D-galactosidase. Journal of Chemical Technology and Biotechnology, 81, 530-543.

Park, A., & Oh, D. (2010). Galacto-oligosaccharide production using microbial ß-galactosidase: Current state and perspectives. Applied Microbiology and Biotechnology, 85, 1279–1286.

Pinho, J., & Passos, F. (2011). Solvent extraction of b-galactosidase from *Kluyveromyces lactis* yields a stable and highly active enzyme preparation. Journal of Food Biochemistry, 35, 323-336.

Pivarnik, L., Senecal, A., & Rand, A. (1995). Hydrolytic and transgalactosylic activities of commercial beta-galactosidase (lactase) in food processing. Advances in Food and Nutrition Research, 38, 1-101.

Playne, M., & Crittenden, R. (2009). Galacto-oligosaccharide and other products derived from lactose. Advanced Dairy Chemistry, 13, 121-201.

Plou, F., Gomez de Segura, A., & Ballesteros, A. (2007). Application of glycosidases and transglycosidases for the synthesis of oligosaccharides. In J. Polaina, & A. MacCabe, Industrial Enzymes: Structure, Function and Application (pp. 141–157). New York: Springer.

Plou, F., Sanz-Apari, J., Sanz-Aparicio, J., & Fernández-Lobato, M. (2017). β-Galactosidases for Lactose Hydrolysis and galactooligosaccharide Synthesis. In M. E. Applications, Microbial Enzymes in Food Applications. New York: CRC Press.

Prazeres, A., Carvalho, F., & Rivas, J. (2012). Cheese whey management: A review. Journal of Environmental Management, 110, 48-68.

Prenosil, J., Stuker, E., & Bourne, J. (1987). Formation of oligosaccharides during enzymatic lactose: Part I: State of art. Biotechnology and Bioengineering, 30, 1019-1025.

Rabiu, B., Jay, A., Gibson, G., & Rastall, R. (2001). Synthesis and fermentation properties of novel galacto-oligosaccharides by beta-galactosidases from *Bifidobacterium* species. Applied and Environmental Microbiology, 67, 2526–2530.

Reuter, S., Nygaard, A., & Zimmermann, W. (1999). β-Galactooligosaccharide synthesis with b-galactosidases from *Sulfolobus solfataricus*, *Aspergillus oryzae*, and *Escherichia coli*. Enzyme and Microbial Technology, 25, 509-516.

Rodriguez-Colinas, B., Fernandez-Arrojo, L., Ballesteros, A., & Plou, F. (2014). Galacto-oligosaccharides formation during enzymatic hydrolysis of lactose: towards a prebiotic-enriched milk. Food Chemistry, 145, 388-394.

Román, A., Wang, J., Csanádi, J., Hodúr, C., & Vatai, G. (2009). Partial Demineralization and Concentration of Acid Whey by Nanofiltration Combined with Diafiltration. Desalination, 241, 288-295.

Sangwan, V., Tomar, S., Singh, R., Singh, A., & Ali, B. (2011). Galacto-oligosaccharides: Novel Components of Designer Foods. Journal of food science, 76, 103-111.

Saqib, S., Akram, A., Halim, S., & Tassaduq, R. (2017). Sources of b-galactosidase and its applications in food industry. 3 Biotech, 7, 79.

Schaafsma, G. (2008). Lactose and lactose derivatives as bioactive ingredients in human nutrition. International Dairy Journal, 18, 458–465.

Seddigh, S., & Darabi, M. (2014). Comprehensive analysis of beta-galactosidase protein in plants based on Arabidopsis thaliana. Turkish Journal of Biology, 38, 140-150.

Shin, H.-J., & Yang, J.-W. (1994). Galacto-oligosaccharide production by β-galactosidase in hydrophobic organic media, Biotechnology Letters, 16, 1157-1162.

Siso, M. I. (1996). The biotechnological utilization of cheese whey: A review. Bioresource Technology, 57, 1-11.

Smithers, G. (2008). Whey and whey proteins - From 'gutter-to-gold'. International Dairy Journal, 18, 695–704.

Smithers, G. (2015). Whey-ing up the options - Yesterday, today and tomorrow. International Dairy Journal, 48, 2-14.

Splechtna, B., Inge, P., Ursula, B., Haltrich, D., Kulbe, K., & Bernd, N. (2001). Production of a lactose-free galacto-oligosaccharide mixture by using selective enzymatic oxidation of lactose into lactobionic acid. Enzyme and Microbial Technology, 29, 434-440.

Splechtna B., Nguyen T.-H., Haltrich D. (2007). Comparison between Discontinuous and Continuous Lactose Conversion Processes for the Production of Prebiotic Galacto-oligosaccharides Using α-Galactosidase from *Lactobacillus reuteri*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 55, 6772-6777.

Szczodrak, J. (2000). Hydrolysis of lactose in whey permeate by immobilized b-galactosidase from *Kluyveromyces fragilis*. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 10, 631-637.

Tanaka, Y., Kagamiishi, A., Kiuchi, A., & Horiuch, T. (1975). Purification and properties of b-galactosidase from *Aspergillus oryzae*. Journal of Biochemistry, 77, 241-247.

Toba, T., Yokota, A., & Adachi, S. (1985). Oligosaccharide structures formed during the hydrolysis of lactose by *Aspergillus oryzae* b-galactosidase. Food Chemistry, 16, 147-162.

Torres, D., Gonçalves, M., Teixeira, J., & Rodrigues, L. (2010). Galacto- Oligosaccharides: Production, Properties, Applications, and Significance as Prebiotics. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 9, 438-454.

Tunick, M., Molina-Corral, F., Javier Molina-Corral, F., Tomasula, P., Call, J., Luchansky, J., & Gardea, A. (2008). Queso Chihuahua: manufacturing procedures, composition, protein profiles, and microbiology. Society of Dairy Technology, 61, 62-69.

Tzortzis, G., & Vulevic, J. (2009). Galacto-Oligosaccharide Prebiotics. Prebiotics and Probiotics Science and Technology, volume, 207-244.

Urrutia P., Rodriguez-Colinas B., Fernandez-Arrojo L., O. Ballersteros A., Wilson L., Illanes A., Plou F.J. (2013). Detailed analysis of Galactooligosaccharides synthesis with β-galactosidase from *Aspergillus oryzae*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 61, 1081-1087.

Vera, C., Córdova, A., Aburto, C., & Guerrero, C. (2016). Synthesis and purification of galacto-oligosaccharides: state of the art. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 32, 197.

Vera, C., Guerrero, C., Conejeros, R., & Illanes, A. (2012). Synthesis of galacto-oligosaccharides by b-galactosidase from *Aspergillus oryzae* using partially dissolved and supersaturated solution of lactose. Enzyme and Microbial Technology, 50, 188-194.

Wang, M., Yang, R., Hua, X., Shen, Q., Zhang, W., & Zhao, W. (2015). Lactulose production from lactose by recombinant cellobiose 2- epimerase in permeabilised *Escherichia coli* cells. International Journal of Food Science and Technology, 50, 1625-1631.

Wendorff, W. (2008). Uses of whey in the farmstead setting. Wisconsin-Madison. Retrieved 11 4, 2018

Wong S.Y., Hartel R.W. (2014). Crystallization in Lactose Refining-A Review. Journal of Food Science, 79, 257-272.

Xavier, J., Ramana, K., & Sharma, R. (2018). β-Galactosidase: Biotechnological applications in food processing. Journal of food biochemistry, 42, 1-15.

Xiao-ming, B., Xiao-yu, Z., Wei-hua, Z., Wen-liang, Y., Wei, P., Wei-li, Z., Schaafsma, A. (2004). Supplementation of milk formula with galacto-oligosaccharides improves intestinal micro-flora and fermentation in term infants. Chinese Medical Journal, 117, 927-931.

Yang, S., & Silva, E. (1995). Novel Products and New Technologies for Use of a Familiar Carbohydrate. Journal of dairy science, 78, 2541-2562.

Zadow, J. (1992). Whey and Lactose Processing. New York: Elsevier Applied Science.

Zechel, D., & Withers, S. (2001). Dissection of nucleophilic and acid–base catalysis in glycosidases. Current Opinion in Chemical Biology, 5, 643-649.

Zhou, Q., & Chen, X. (2001). Effects of temperature and pH on the catalytic activity of the immobilized β-galactosidase from *Kluyveromyces lactis*. Biochemical Engineering Journal, 9, 33-40.

Γαλάνη, Ι.Ε. (2016), Παραγωγή συστατικών υψηλής προστιθέμενης αξίας από τα απόβλητα της βιομηχανίας γιαουρτιού, Διπλωματική εργασία, Σχολή Χημικών Μηχανικών (ΕΜΠ)